

UNIVERSIDA DE ALCALÁ

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA



**AUTO-AGREGACIÓN Y FORMACIÓN DE
COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE
CICLODEXTRINAS MODIFICADAS CON
COMPUESTOS MODELOS**

TESIS DOCTORAL

M^aJosé González Álvarez

Alcalá de Henares, 2012

Dr. Francisco Mendicuti Madrid, Catedrático del Departamento de Química Física de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria, titulada: “**Auto-agregación y formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas modificadas con compuestos modelos**”, ha sido realizada por Dña. M^a José González Álvarez en el Departamento de Química Física de la Universidad de Alcalá bajo mi dirección y autorizo su presentación para su defensa y aprobación como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firma la presente en Alcalá de Henares, a 30 de Enero de 2012.

Dr. Francisco Mendicuti Madrid

Dr. Miguel Ángel Esteso Díaz, Director del Departamento de Química Física de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en la presente Memoria, titulada: **“Auto-agregación y formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas modificadas con compuestos modelos”**, ha sido realizada por Dña. M^a José González Álvarez en el Departamento de Química Física de la Universidad de Alcalá bajo la supervisión del Dr. Francisco Mendicuti Madrid y reúne a su entender todos los requisitos necesarios para su defensa y aprobación como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firma la presente en Alcalá de Henares, a 30 de Enero de 2012.

Dr. Miguel Ángel Esteso Díaz

A mis padres, José Luis y M^{ra} Cruz

A quienes les debo todo. Gracias.

A mis hermanas, M^{ra} Cruz y M^{ra} Elena.

Por vuestras risas, ánimos y abrazos

Esta Tesis nunca podría haberse realizado sin la ayuda del Prof. Francisco Mendicuti. Gracias Curro por haber sido mi director, mi amigo y muchas veces mi padre dentro y fuera del departamento. Gracias por haberme brindado tu confianza y haberme dado independencia y responsabilidad que tanto me han ayudado a desarrollarme como investigadora y persona. Gracias por todas nuestras charlas y discusiones en el sillón verde. ¡Campai! por todos los buenos momentos.

Gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca FPU y por la financiación del proyecto CTQ2008-03149/BQU.

Gracias a mis compañeros del departamento de Química Física con especial cariño a todos los profesores, por haberme apoyado siempre en realización de esta tesis. Gracias a Enrique y Pilar, por todos vuestros consejos y ánimos y por sacarme siempre de mis dudas. Gracias Jesús por todos tu apoyo y cariño (espero que algún día nos casemos en Juarros), a M^aJesús por tu eterna sonrisa y tu voluntad para ayudarme. Meli echaré de menos nuestras “charlas nocturnas” y ahora ten cuidado que *te quedas solita...* A mis *Portus*, Caterina y Damien, por todos los momentos que pasamos.

Gracias a mis compañeros de grupo POLSUP, en especial a ese hombre de negro y sus puntos de locura llamado Thais y a la chica “atómica” Natalia, por su serenidad y esa paz que transmite. Os deseo todo lo mejor en vuestro futuro en el grupo.

Gracias a los Prof.^a Carmen Ortiz Mellet y el Prof. José Manuel García Fernández por haberme dado los “ladrillos” para construir esta tesis y por toda su ayuda.

Thank you to Professor Nau for giving me the chance to work in his lab and to Mara Florea for showing me that “research is a shit sometimes, but we will manage to take control”.

Porque detrás de un gran hombre siempre hay una gran mujer, muchas gracias Marouchka por haber tenido siempre tiempo para ayudarme, porque a pesar de mis “rollos” nunca has perdido la consciencia para darme muy buenos consejos. Por todo tu apoyo.

No puedo olvidarme de toda la gente del departamento de Inorgánica que tantas veces me ha apadrinado. Gracias Chema por haberme metido ese gusanito de la investigación con tus RMN llenos de picos de “compuestos nuevos”. Gracias Prof. Ernesto de Jesús por toda la ayuda que siempre me ha brindado durante la carrera y el doctorado. Gracias Jimmy por todas nuestras charlas sobre el psicoanálisis, la crisis y la vida...¡por todos tus consejos!

Por supuesto gracias a mis *químicas* por todos los buenos ratos que hemos compartido y me han dado tantos ánimos para terminar la tesis. Gracias Vero, por tu alegría y por ser la reina de nuestras coreografías; a Raquel por esa dualidad “tradición-moderna locura” que tantas veces más hecho sonreír; a Cris por nuestras terapias de grupo y por ser simplemente *alternativa*; y con especial cariño a Alba, por haber convertido el 4677 en el “teléfono de la esperanza” en tantas ocasiones. Gracias por tus ánimos constantes y preocuparte siempre por mí, por haberme acompañado dentro y fuera del laboratorio compartiendo momentos inolvidables.

Gracias Chechu por todos tus cafés y consejos, por tener esa cualidad para aportarme sensatez y razón cuando lo veo todo negro.

Gracias a mis *Pollos*, Rocío y Laura porque sin vuestras locuras, nunca podría haber estado cuerda para terminar esta tesis. Gracias por todas nuestras aventuras que me han dado tanta energía. Gracias por haber estado a mi lado y siempre haber podido contar con vosotras.

Gracias a toda mi familia (mis tíos, primos, abuelos) que tantas veces se han preocupado por mí y me han dado esos empujoncitos para realizar esta tesis. A mis hermanas, M^aCruz y Elena por sus risas y abrazos, sus “¡Venga Coké!” que tantas fuerzas me han dado, sus discusiones sobre la “bicicleta de cromo” y acompañarme sábados y domingos en el laboratorio.

Sobre todo mil gracias a mis padres por habérmelo dado todo. Nunca podré devolveros todo lo que habéis aportado, por tener siempre tiempo para ayudarme, por vuestros “todo lo que te propongas”, ánimos y noches en vela compartiendo mis alegrías y preocupaciones.

ÍNDICE

1. Introducción	1
Referencias	6
 2. Procesos Fotofísicos.....	9
2.1 Introducción	11
2.2 Procesos fotofísicos.....	11
2.2.1 Excitación o absorción	12
2.2.2 Desactivación	13
2.2.2.1 Procesos no radiativos	13
2.2.2.2 Procesos radiativos	14
2.3 Referencias	15
 3. Fundamentos de Fluorescencia	17
3.1 Introducción	19
3.2 Principios de Fluorescencia.....	20
3.3 Procesos competitivos con la Fluorescencia	22
3.3.1 Desactivación bimolecular	22
3.3.2 Formación de excímeros y exciplejos	25
3.3.3 Transferencia de energía electrónica.....	27
3.4 Fluorescencia aplicada a ciclodextrinas	29
3.5 Referencias	30
 4. Fundamentos de Dicroísmo Circular	33
4.1 Introducción	35
4.2 Fundamentos de Dicroísmo Circular	36
4.3 Acoplamiento Excitónico.....	39
4.3.1 Propiedades y aspectos prácticos	41
4.4 Dicroísmo Circular aplicado a ciclodextrinas	42
4.4.1 Tipos de Dicroísmo Circular para complejos con ciclodextrinas	42
4.4.2 Aplicaciones de Dicroísmo Circular para la caracterización de complejos con ciclodextrinas	45

4.4.3 Fundamentos teóricos de Dicroísmo Circular Inducido aplicado a ciclodextrinas.....	46
4.5 Referencias	48
5. Fundamentos de Mecánica y Dinámica Molecular	51
5.1 Introducción	53
5.2 Mecánica Molecular.....	53
5.3 Dinámica Molecular.....	60
5.4 Simulaciones con disolvente	66
5.4.1 Molecular Silverware	66
5.4.2 Condiciones Periódicas de Contorno (PBC)	67
5.5 Metodología utilizada en la simulación de los diferentes procesos	68
5.5.1 Inclusión de una molécula huésped en ciclodextrinas hidroxipropiladas (Capítulo 7).....	68
5.5.2 Estructura y procesos de dimerización de ciclodextrinas modificadas (<i>Xm</i> - y <i>Nm</i> CDs) (Capítulos 8 y 9)	70
5.5.3 Inclusión de una molécula huésped en ciclodextrinas modificadas (<i>Xm</i> CDs y <i>m</i> CDs) (Capítulo 10).....	75
5.6 Referencias	76
6. Parte Experimental	79
6.1 Descripción de los instrumentos	81
6.1.1 Instrumentación de Fluorescencia.....	81
6.1.1.1 Espectrofluorímetro de Estado Estacionario.....	81
6.1.1.2 Espectrofluorímetro de Resolución Temporal	83
6.1.2 Espectrofotómetro de Dicroísmo Circular	87
6.1.3 Espectrofotómetro UV-Vis	89
6.2 Sistemas de estudio y materiales utilizados	89
6.2.1 Ciclodextrinas (CDs)	89
6.2.2 Moléculas huésped	90
6.2.3 Disolventes.....	90
6.3 Preparación de las disoluciones	91
6.4 Glosario de compuestos utilizados.....	94
6.5 Referencias	96

7. Estudio de Dicroísmo Circular Aplicado a Complejos de Inclusión	99
7.1 Introducción	101
7.2 Estudio de complejos de inclusión del 2,3-naftoato de dimetilo con α -, β - y γ HPCDs	101
7.2.1 Resultados por Fluorescencia y Mecánica Molecular.....	101
7.2.2 Medidas de Dicroísmo Circular	110
7.3 Estudio de complejos de inclusión del 1-naftoato de metilo con α -, β - y γ HPCDs	115
7.3.1 Resultados por Fluorescencia y Mecánica Molecular.....	115
7.3.2 Medidas de Dicroísmo Circular	120
7.4 Conclusiones	122
7.5 Referencias	122
 8. Estudio de la Dimerización y Heteroasociación de Ciclodextrinas Modificadas con Xilileno	 125
8.1 Introducción	127
8.2 Resultados y discusión	131
8.3 Conclusiones	155
8.4 Referencias	156
 9. Estudio de la Dimerización y Heteroasociación de Ciclodextrinas Modificadas con Naftaleno	 159
9.1 Introducción	161
9.2 Resultados y discusión	164
9.3 Conclusiones	194
9.4 Referencias	195
 10. Study of the Complexation of a Polarity Sensitive Probe with Modified Cyclodextrins.....	 199
10.1 Introduction	201
10.2 Results and discussion.....	204
10.3 Conclusions	223
10.4 References	224

Summary and Conclusions.....227

Anexo I235

Anexo II.....241

Introducción

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades D-(+)-glucopiranososa conectadas entre sí por enlaces glucosídicos del tipo $\alpha(1\rightarrow4)$. En la Figura 1.1, se muestran las más conocidas, formadas por 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa y denominadas como α -, β - y γ -CD, respectivamente.¹ Las CDs son intrínsecamente quirales, ya que están compuestas por la repetición de azúcares que presentan actividad óptica.

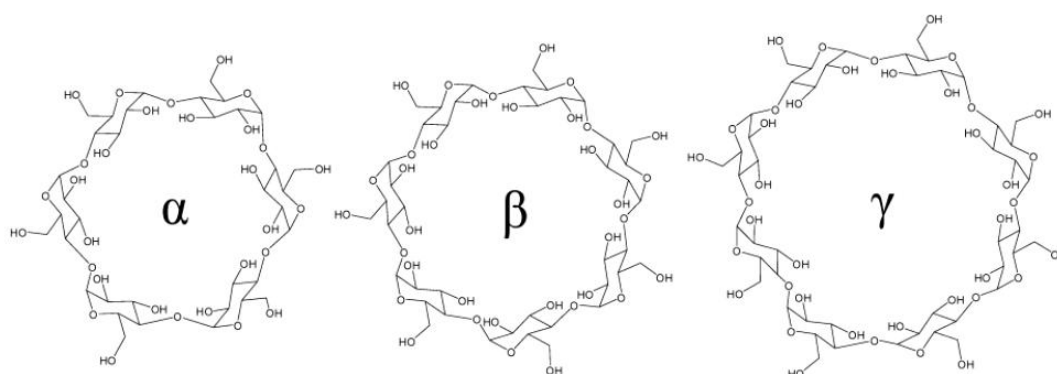


Figura 1.1. Estructura química de los tres tipos de ciclodextrinas más importantes.

La principal característica es la capacidad para formar complejos de inclusión. Debido a su forma hueca de cono truncado y a su cavidad relativamente apolar,² las CDs son capaces de actuar como moléculas *anfitrión* pudiendo albergar en su interior una gran variedad de moléculas *huésped*.³ Es importante señalar que no son sistemas rígidos, sino que poseen una relativa flexibilidad, que les permite asociarse con una gran variedad de moléculas pudiéndose unir, en cada caso, de manera muy diferente.^{1,4} Al mismo tiempo, tienen la capacidad para reconocer y complejarse de forma selectiva con huéspedes específicos, por lo que se dice que tienen la propiedad de *reconocimiento molecular*.⁴ Por otro lado, hay que destacar que se tratan de productos naturales producidos a partir de la degradación enzimática de un material natural como es el almidón. Esto hace que su efecto tóxico sea muy bajo y puedan utilizarse en medicamentos, alimentos o cosméticos.

Todas estas características mencionadas han hecho que las CDs se hayan convertido en uno de los receptores moleculares más importantes y estudiados en la química supramolecular, originando el nacimiento de la *Química de la Ciclodextrina* que implica

la investigación de sus propiedades, el estudio de sus posibles modificaciones y la búsqueda de nuevas aplicaciones.⁵⁻⁷

Aunque el mayor porcentaje de CDs usadas comercialmente corresponde a la alimentación⁸ y a la cosmética,⁹ es indudable que uno de los mayores esfuerzos en investigación está relacionado con su potencial aplicación farmacéutica,^{10,11} como potenciales portadores y liberadores de fármacos y de material genético.¹² Una buena parte de los fármacos son poco solubles en agua y, consecuentemente, su absorción biológica es lenta y con frecuencia poco eficaz, además muchos de ellos son sensibles a la oxidación, pueden descomponerse por la luz y el calor, o ser volátiles y a veces pueden producir efectos secundarios. La mayoría de estos problemas y limitaciones de uso pueden quedar solventadas mediante su asociación con CDs.¹³

En la actualidad, las CDs y sus derivados ofrecen también otras muchas posibilidades de aplicación: son eficaces en la separación cromatográfica mediante el reconocimiento molecular de mezclas de sustancias complejas, incluyendo la diferenciación de moléculas enantioméricas;^{14,15} tienen actividad catalítica, siendo de interés como modelos enzimáticos; se utilizan como receptores de nucleótidos; precursores de tubos moleculares; sensores químicos, etc.¹ También, la construcción de estructuras supramoleculares entre polímeros y CDs en el diseño de hidrogeles,¹⁶ nanopartículas poliméricas, pseudo- y polirrotaxanos, está teniendo un gran auge en los últimos años por sus aplicaciones en biomedicina⁵ y en la nanotecnología¹⁷ como conductores poliméricos aislados en el canal de CDs,^{18,19} como motores bioquímicos que simulan movimientos musculares naturales y máquinas moleculares tipo cilindro-pistón,²⁰ etc.

Aunque las CDs naturales son capaces de albergar en su interior una gran variedad de moléculas, su modificación química mejora muchas de sus propiedades (capacidad de complejación, enantioselectividad, solubilidad, bioabilidad, etc.) frente a diferentes huéspedes,²¹ lo que le permite diseñar moléculas anfitrión, “a la carta”, específicas para determinadas aplicaciones.²²⁻²⁴ Un ejemplo, son aquellas modificadas con un sustituyente orgánico que puede contener un grupo cromóforo (Figura 1.2) que, como veremos posteriormente, forma parte de nuestro trabajo de investigación. Dependiendo del tamaño, forma, flexibilidad o características hidrofóbicas de este sustituyente se pueden dar diferentes procesos: (a) equilibrios conformacionales donde el sustituyente puede actuar bloqueando o facilitando la entrada en la cavidad, (b) procesos de autoinclusión del

sustituyente y/o (c) de agregación para dar lugar a dímeros y/o oligómeros no-covalentes. Todos estos procesos son competitivos entre sí y con los de complejación con cualquier molécula huésped. Por ello pueden ser empleados, dependiendo del tipo de sustituyente, para regular la inclusión y liberación de moléculas huésped por medio de estímulos externos, como pH, polaridad del medio, temperatura, etc.³ Además este tipo de CDs modificadas con grupos cromóforos está siendo utilizada como sensores foto- y electroquímicos y colectores de luz.²⁵

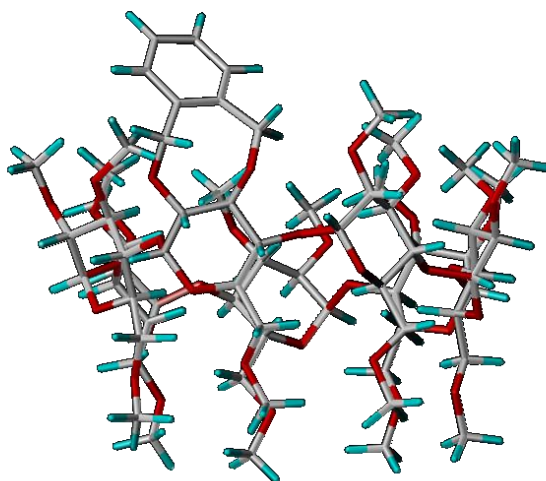


Figura 1.2. Ejemplo de una β -CD modificada donde todos los grupos $-\text{OH}$ se encuentran metilados y además contiene en la cara secundaria un ligando bidentado tipo xileno.

Nuestro grupo tiene una amplia experiencia en el estudio de complejación con CDs naturales de moléculas precursoras de polímeros (poliésteres), de moléculas sensibles a la polaridad y viscosidad del medio, de fármacos, de separación de moléculas quirales con CD modificadas²⁶⁻³³ y de formación de complejos con polímeros lineales (polirrotaxanos).³⁴⁻³⁶ Nuestra metodología de trabajo se basa en sistematizar, racionalizar y explicar el comportamiento de cualquiera de estos sistemas huésped-anfitrión, buscando una relación entre su estructura microscópica y las características y propiedades macroscópicas de los mismos. El procedimiento de trabajo consiste en realizar medidas experimentales y cálculos teóricos de propiedades y magnitudes sensibles a la microestructura del sistema, es decir, a las conformaciones, estructura y dinámica, a las posibles interacciones intra- o intermoleculares responsables de su estabilidad, distancia y orientación relativa de grupos concretos (cromóforos), etc. En este sentido, hemos

aplicado dicha metodología al estudio de los diferentes procesos competitivos, a los que antes hacíamos referencia, que se dan en algunas CDs modificadas con grupos cromóforo, aisladas o en presencia de moléculas huésped sensibles al medio.

El trabajo realizado y descrito a lo largo de esta Tesis, ha consistido en:

- Puesta a punto de un espectrofotómetro de dicroísmo circular y su aplicación en el campo de complejos de inclusión con ciclodextrinas. Comparación de los resultados obtenidos con los de otras técnicas experimentales y teóricas para corroborar la estructura de estos sistemas en disolución (Capítulo 7).
- Comportamiento fotofísico, conformacional y estructural de ciclodextrinas de nueva síntesis modificadas en la cara secundaria por un grupo cromóforo xilileno (Capítulo 8) o naftaleno (Capítulo 9), así como de la termodinámica de autoasociación en disolución acuosa.
- Estudio del efecto que tiene la autoasociación de ciclodextrinas y el sustituyente unido a la CD en la complejación con otras moléculas huésped sensibles al entorno (Capítulo 10).

Para llevar a cabo el trabajo de investigación se han utilizado diferentes técnicas espectroscópicas (Capítulo 2), como Fluorescencia (Capítulo 3) y Dicroísmo Circular (Capítulo 4), además de simulaciones teóricas de Mecánica Molecular y Dinámica Molecular (Capítulo 5).

Por último señalar que en cada uno de los capítulos aparece una introducción más detallada, explicando los antecedentes y estado actual del trabajo desarrollado en el mismo.

Referencias

- (1) Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- (2) Liu, Y.; Han, B.-H.; Zhang, H.-Y. *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 35.
- (3) Douhal, A. *Cyclodextrins Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology* Elsevier: Amsterdam, 2006.

- (4) Cyclodextrins. En *Macrocycles: Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications*; Davis, F., Higson, S., Eds.; Wiley, 2011; pp 190.
- (5) van, d. M. F.; Vermonden, T.; van, N. C. F.; Hennink, W. E. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3157.
- (6) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743.
- (7) Szejtli, J. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1825.
- (8) Walter, R. H. *Polysaccharide Association Structures and Methods in Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons: Nueva York 2000.
- (9) Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E. *Journal of Cosmetic Science* **2002**, *53*, 185.
- (10) Frömming, K.-H.; Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*; Kluwer Acad. Publ: Dordrecht, 1994
- (11) Loftsson, T.; Duchêne, D. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *329*, 1.
- (12) Mellet, C. O.; García Fernández, J. M.; Benito, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1586.
- (13) Szente, L.; Szejtli, J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *36*, 17.
- (14) Juvancz, Z.; Szejtli, J. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 379.
- (15) Li, S.; Purdy, W. C. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1457.
- (16) Álvarez-Lorenzo, C.; Rosa dos Santos, F.; Sosnik, A.; Torres-Labandeira, J. J.; Concheiro, A. Hydrogels with cyclodextrins as highly versatile drug delivery systems. En *Handbook of Hydrogels: Properties, Preparation & Applications*; Stein, D. B., Ed.; Nova Science Publishers, Inc., 2009; pp 61.
- (17) Balzani, V.; Credi, A.; Venturi, M. *Molecular Devices and Machines: Concepts and Perspectives for the Nanoworld*, 2º ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008.
- (18) Wenz, G. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 6333.
- (19) Yui, N.; Ooya, T. *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 6730.
- (20) Harada, A. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 456.
- (21) Engeldinger, E.; Armspach, D.; Matt, D. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4147.
- (22) Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *Modified Cyclodextrins, Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry*; Imperial College Press: Londres, 2000.
- (23) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977.
- (24) Liu, Y.; Chen, Y. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 681.
- (25) Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8*, 4961.

- (26) Madrid, J. M.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2037.
- (27) Pozuelo, J.; Nakamura, A.; Mendicuti, F. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **1999**, *35*, 467.
- (28) Junquera, E.; Mendicuti, F.; Aicart, E. *Langmuir* **1999**, *15*, 4472.
- (29) Pastor, I.; Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1995.
- (30) Bicchi, C.; Brunelli, C.; Cravotto, G.; Rubiolo, P.; Galli, M.; Mendicuti, F. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 1479.
- (31) Pastor, I.; DiMarino, A.; Mendicuti, F. *J. Photochem. Photobiol., A* **2005**, *173*, 238.
- (32) Alvariza, C.; Usero, R.; Mendicuti, F. *Spectrochim. Acta, Part A* **2007**, *67*, 420.
- (33) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *58*, 295.
- (34) Pozuelo, J.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *Macromolecules* **1997**, *30*, 3685.
- (35) Pozuelo, J.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *Polym. J.* **1998**, *30*, 479.
- (36) Pozuelo, J.; Mendicuti, F. *Proceedings of the 12th International Symposium on Cyclodextrins, Ed. Santé*, **2004**, 225.

Procesos Fotofísicos

2.1 Introducción

Cuando la radiación electromagnética incide sobre una molécula, puede ser absorbida por ella lo que puede originar una reacción química, dando lugar a lo que se conoce como *proceso fotoquímico*. En este caso, la molécula pierde su estructura inicial, rompiéndose y formándose nuevos enlaces. Por otro lado, es posible que como consecuencia de la interacción, se origine simplemente un cambio en las propiedades de la radiación, sin necesidad de producirse absorción y/o emisión. Puede ocurrir también que la energía electromagnética interaccione con la molécula y haga que ésta pase a un estado excitado, en el que permanece durante un periodo de tiempo muy corto, para regresar intacta a su estado fundamental sin haber sufrido ningún tipo de reacción química. En este proceso se cede la energía absorbida, en forma de fotones o térmicamente, dando lugar a lo que se denomina *proceso fotofísico*.

2.2 Procesos fotofísicos

Después de que la radiación incida en la molécula, se pueden producir diversas transformaciones o tránsitos energéticos que dan lugar a un gran número de fenómenos.¹

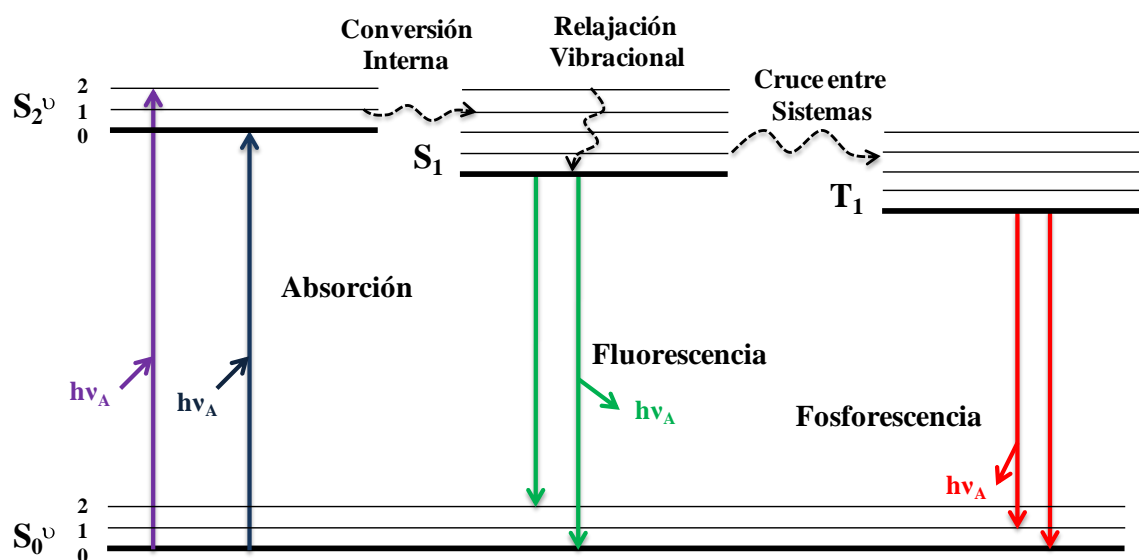


Figura 2.1. Diagrama de Jablonski.

Todos estos procesos se muestran en el diagrama de Jablonski^{2,3} (Figura 2.1). $S_0, S_1, S_2, \dots S_n$ representan los estados singlete en los diversos estados electrónicos y $T_1, T_2, \dots T_n$ los estados triplete. Las líneas rectas indican activación o desactivación *radiativa*, mientras que las onduladas se refieren a las *no radiativas*. Dentro de cada nivel electrónico, existen niveles vibracionales que se representan con un superíndice, así S_0^1 se refiere al primer estado vibracional del estado electrónico singlete fundamental.⁴

Si nos fijamos en el diagrama, dependiendo del tipo de tránsito, radiativo o no radiativo, de los estados energéticos de los que se parte y a los que se llega, se producen distintos procesos físicos que, de manera general, se pueden resumir en dos:

2.2.1. Excitación o absorción. Cada molécula absorbe un fotón que produce un tránsito energético del tipo:



La velocidad de este proceso vendrá definida por la cantidad de fotones absorbidos por unidad de tiempo y volumen, que coincidirá con la velocidad de desaparición de especies en el estado fundamental, o de aparición de especies en el estado excitado según la expresión:

$$I_A = -\frac{d[M]}{dt} = k [M^*] \quad 2.1$$

donde M representa la molécula en estado fundamental y M^* es la misma molécula en el estado excitado S_n^v . I_A es la intensidad de luz absorbida por la molécula por unidad de volumen y tiempo.

Cuando un rayo de luz monocromática de intensidad, I_0 , pasa a través de una sustancia que absorbe de forma homogénea, la intensidad de luz transmitida, I_t , viene dada por la ley de Lambert–Beer:

$$I_t = I_0 10^{-\epsilon c d} \quad 2.2$$

donde ϵ es el coeficiente de absorción molar, c es la concentración de especies absorbidas y d es la longitud de la trayectoria atravesada por el rayo. La intensidad absorbida vendrá dada entonces por la ecuación:

$$I_A = I_0 - I_t = I_0 (1 - 10^{-\epsilon c d}) \quad 2.3$$

La absorbancia, A, es la magnitud que se mide normalmente y se define como:

$$A = -\log(I_t/I_0) = \epsilon c d \quad 2.4$$

En un espectro de absorción electrónica, la radiación absorbida corresponde a la zona del ultravioleta y visible, que posee una energía adecuada para dar lugar a tránsitos entre estados electrónicos en los que están implicados los electrones de valencia. Las moléculas en las que se originan estas transiciones se denominan *cromóforos* y se caracterizan por presentar grupos funcionales, generalmente compuestos aromáticos, que contienen preferentemente electrones en orbitales π y en orbitales no enlazantes; los procesos fotofísicos, en la región del espectro indicada, se producen generalmente por transiciones del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$.

2.2.2. Desactivación. Una vez que la molécula se encuentra en el estado excitado debe volver a su estado fundamental, para ello se desactivará mediante procesos *no radiativos* o *radiativos*.

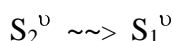
2.2.2.1. Procesos no radiativos

Son aquellos procesos en los cuales la energía de excitación se disipa por la molécula en forma de calor. Se clasifican en:

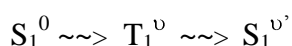
a) *Relajación vibracional y rotacional* (RV). Es un proceso exotérmico muy rápido ($\tau = 10^{-11}$ - 10^{-12} s) producido principalmente por choques entre moléculas del sistema, que corresponde a una transición entre niveles vibracionales dentro de un mismo estado electrónico. Se puede representar como:



b) *Conversión interna* (CI). Es un fenómeno isoenergético que supone la transferencia de población entre estados electrónicos de igual multiplicidad de espín, debido a que al cruzarse las curvas de potencial, existen niveles vibracionales y rotacionales que pertenecen a ambos estados. También es un proceso muy rápido ($\tau = 10^{-11}$ - 10^{-14} s). Se describe como:



c) *Cruce entre sistemas* (CS). Es un proceso similar a la conversión interna pero en este caso los niveles son estados energéticos de distinta multiplicidad, lo que teóricamente es una transición prohibida y por tanto, más lenta ($\tau = 10^{-7}$ - 10^{-11} s). Esta transición es más probable entre niveles de alta energía donde la diferencia entre los estados es menor. Se puede definir como:



2.2.2.2. Procesos radiativos

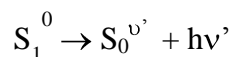
Suponen la emisión de fotones de la molécula excitada cuando pasa a su estado fundamental. Se pueden distinguir:

a) *Fosforescencia*. Es la transición espectroscópica que se produce desde el estado vibracional triplete más bajo T_1^0 a los niveles vibracionales singlete de S_0^v . Es una transición prohibida, tanto en emisión como en absorción, por lo que se trata de un proceso lento ($\tau=10^2$ - 10^3 s). Para que tenga lugar, es necesario un cruce entre niveles de distinta multiplicidad (CS). Al ser éste último un proceso lento y competitivo con la fluorescencia y otros procesos de desactivación no radiativos, la fosforescencia solo tendrá lugar en determinados sistemas y bajo determinadas condiciones experimentales. Se puede expresar mediante:



b) *Fluorescencia*. Es una transición radiativa entre niveles de igual multiplicidad. Esta transición se produce entre los estados singlete y normalmente, desde el nivel de más

baja energía vibracional S_1^0 a los estados vibracionales del estado fundamental $S_0^{v'}$. Aún en el caso de que se exciten niveles superiores, el tránsito se producirá desde S_1^0 , ya que los procesos no radiativos son mucho más rápidos. El proceso de fluorescencia lo podemos representar como:



2.4 Referencias

- (1) Espectroscopia Molecular 2: Transiciones electrónicas. En *Química Física*; Atkins, P., Paula, J. d., Eds.; Editorial Panamericana, 2007.
- (2) Rabeck, J. F. *Mechanics of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers: Theory and Applications.* ; John Wiley & Sons.: Chichester, 1987.
- (3) Guillet, J. *Polymer Photophysical and Photochemistry*; Cambridge University Press, 1985.
- (4) Turro, N. J. *Principles of Molecular Photochemistry*; University Science Books: Sausalito, California, 2009.

Fundamentos de Fluorescencia

3.1 Introducción

El campo de la fluorescencia está en continuo crecimiento, tanto en aspectos del desarrollo de nuevas técnicas, como en la instrumentación o en sus aplicaciones. Esto hace que se haya convertido en una herramienta imprescindible, presente en numerosas disciplinas científicas (biotecnología, nanotecnología, bioquímica, física) y en gran número de aplicaciones para el análisis y el estudio del día a día (químico, farmacéutico, médico, alimenticio, forense, etc.). El aumento en el interés sobre esta técnica reside en las ventajas de la resolución temporal, en su alta sensibilidad y selectividad y en los avances en la instrumentación. Con todo este progreso, ahora es fácil y práctico realizar medidas de fluorescencia con la suficiente precisión para establecer relaciones sobre los resultados obtenidos para un sistema macromolecular y su estructura química o sus características dinámicas; para estudiar las proteínas, membranas y ácidos nucleicos; para adquirir imágenes microscópicas sobre la distribución de sustancias químicas o proteínas en una célula, etc.^{1,2}

La fluorescencia fue una de las primeras técnicas empleadas como método de detección para la determinación cualitativa y cuantitativa de analitos de diferente naturaleza. Entre sus ventajas como herramienta analítica destacan ser extremadamente sensible, selectiva (pudiéndose detectar hasta moléculas individuales³), no invasiva, relativa facilidad de uso y su capacidad para ser utilizada como elemento de detección en diferentes tipos de técnicas instrumentales.⁴

En química inorgánica, se emplea para estudiar compuestos que son difíciles de detectar y cuantificar por espectroscopia UV-Visible o por absorción atómica. Además se utiliza para la caracterización de complejos inorgánicos y estudiar sus aplicaciones biofísicas, donde destaca su uso como sondas fluorescentes para el estudio dinámico del ADN, proteínas e interacciones con lípidos.⁵

Por otro lado, se trata de una metodología dominante usada de forma extensiva en la biotecnología, citometría, secuenciación de ADN, estudios genéticos, entre otros, al tratarse de una técnica no destructiva y caracterizarse por alcanzar niveles de detección del orden de partes por billón, cantidades que por otras técnicas serían difíciles de detectar.² Muchos sistemas bioquímicos presentan fluorescencia intrínseca, pero si originalmente no lo son, pueden ser transformados en especies de este tipo, bien uniendo covalentemente un simple cromóforo (*label o etiqueta*) o añadiendo al medio una baja

concentración de moléculas fluorescentes (*probe* o *sonda*).⁶ En ambos casos la baja concentración de especie fluorescente añadida apenas perturba al sistema, pero permite, sin embargo, obtener información del mismo estudiando los cambios en las propiedades fluorescentes de esas moléculas añadidas.^{2,7}

3.2 Principios de Fluorescencia

Como vimos anteriormente, una molécula previamente excitada por absorción de una radiación electromagnética puede regresar a su estado fundamental emitiendo energía radiante en forma de fotones. Cuando este proceso tiene lugar desde el nivel más bajo de energía vibracional del estado electrónico singlete (S_1^0), a cualquier nivel vibracional del estado fundamental singlete (S_0^v), se denomina *fluorescencia*.⁸

Las características generales del fenómeno de fluorescencia son:^{1,6}

Desplazamiento Stokes

En el diagrama de Jablonski (Capítulo 2, Figura 2.1), se observa que la energía de emisión es menor (mayor longitud de onda) que la energía de absorción. Esta pérdida entre la excitación y la emisión es una característica típica de fluoróforos en disolución y se conoce como *desplazamiento Stokes* (Figura 3.1). Una causa común de este fenómeno es el rápido decaimiento al nivel más bajo de energía vibracional del nivel S_1 mediante procesos de relajación vibracional. El desplazamiento Stokes depende de la naturaleza del disolvente, presencia de formación de complejos, transferencia de energía, etc.

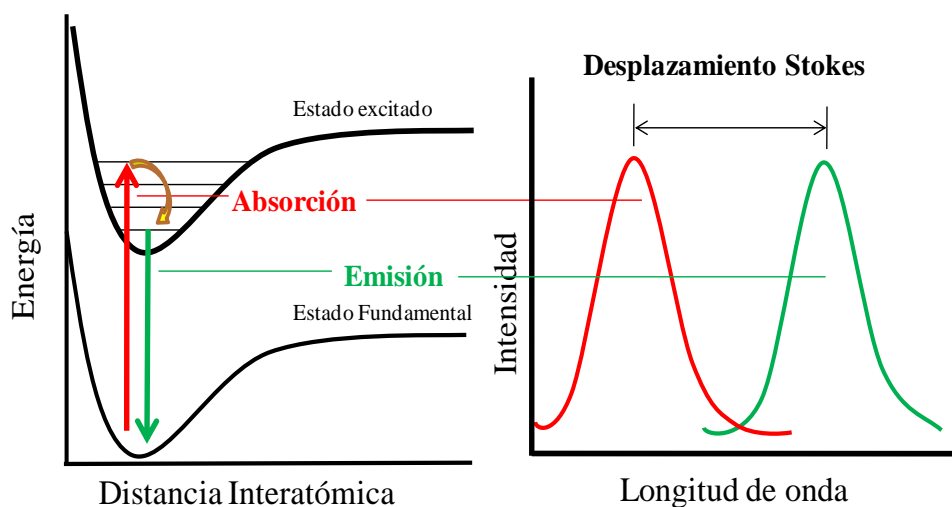


Figura 3.1. Esquema de un espectro de absorción y de emisión donde se ilustra el desplazamiento Stokes.

Independencia del espectro de emisión con respecto a la longitud de onda de excitación

De forma general, el espectro de emisión obtenido es independiente de la longitud de onda con la que se excite al cromóforo, es decir, del estado electrónico-vibracional que se alcance. Una vez que la molécula se excita, la relajación vibracional es tan rápida que cuando se produce la emisión por fluorescencia, el cromóforo se encuentra en el nivel más bajo de energía vibracional del estado electrónico S_1 .

Rendimiento cuántico y tiempo de vida medio

El rendimiento cuántico y el tiempo de vida medio son seguramente las dos características más importantes de un fluoróforo:

- El *rendimiento cuántico* ϕ se define como la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos.
- El *tiempo de vida medio* determina el tiempo que un fluoróforo permanece en el estado excitado S_1 antes de caer al fundamental, S_0 . Generalmente, suele ser del orden de ns.

Ambas propiedades están relacionadas mediante la expresión:

$$\tau_n = \frac{\tau}{\phi} \quad 3.1$$

donde τ_n es el tiempo de vida en ausencia de procesos no radiativos denominado *intrínseco* o *natural* y τ es el tiempo de vida experimental.

Polarización y anisotropía

Los fluoróforos absorben preferentemente fotones cuyo vector eléctrico está alineado de forma paralela con el momento de la transición del fluoróforo.⁹ Cuando se excita con luz polarizada, solo se excitan aquellas moléculas cuyo momento de la transición electrónica de absorción sea paralelo al vector eléctrico de la radiación de excitación. La emisión también ocurre de forma polarizada a lo largo de un determinado eje de la molécula. El ángulo relativo entre los momentos determina los conceptos de anisotropía (r) y polarización (P):

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad 3.2$$

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \quad 3.3$$

donde $I_{//}$ y I_{\perp} son la intensidades de emisión de fluorescencia polarizadas de forma paralela y perpendicular con respecto a la luz de excitación verticalmente polarizada, respectivamente. Muchos fenómenos pueden hacer disminuir ambos parámetros, algunos de los más importantes son los procesos de difusión rotacional y los cambios conformacionales. Dichos procesos pueden ocurrir entre la excitación y la emisión de la radiación, es decir durante el tiempo de vida del estado excitado, y originan el desvío en el dipolo de emisión del fluoróforo.

3.3 Procesos competitivos con la Fluorescencia

Existen otros procesos interesantes que compiten con la fluorescencia y pueden proporcionar una valiosa información sobre la polaridad y microviscosidad del medio que rodea al cromóforo, su accesibilidad, formación de complejos en estado excitado, fenómenos de difusión, estructura, etc. Los más importantes son la desactivación bimolecular, la formación de excímeros y exciplejos y la transferencia de energía electrónica.⁹

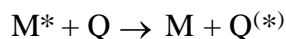
3.3.1 Desactivación bimolecular

La desactivación bimolecular (o también llamada *quenching bimolecular*) es el proceso de disipación no radiante de la fluorescencia debido a la interacción entre el cromóforo y otra molécula del medio llamada desactivador (o *quencher*, Q).

La desactivación permite obtener información sobre la localización y accesibilidad del cromóforo en un determinado sistema, la difusión del mismo y del desactivador, la presencia o no de complejos, procesos de transferencia y migración de energía, etc.^{1,6}

Dependiendo del tipo de interacción podemos distinguir dos tipos de desactivación, *dinámica* y *estática*:

Desactivación dinámica (o por colisión). Se produce cuando el cromóforo, en estado excitado, colisiona con el desactivador transfiriendo su energía a éste. El desactivador, que se encuentra en estado fundamental, absorbe la energía aunque no pasa necesariamente a un estado electrónico excitado. El proceso sería:



La desactivación dinámica de fluorescencia viene descrita por la ecuación de Stern–Volmer (Ecuación 3.4), que relaciona las intensidades o los rendimientos cuánticos de fluorescencia, en ausencia y presencia del desactivador, con la concentración del desactivador:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D [Q] \quad 3.4$$

siendo F_0 y F las intensidades de fluorescencia, a una longitud de onda determinada, en ausencia y presencia del desactivador respectivamente (la ecuación con los rendimientos cuánticos sería equivalente, teniendo la misma forma).

Se denomina constante de desactivación de Stern–Volmer, K_D , al producto de la constante de desactivación bimolecular, k_q , por el tiempo de vida del cromóforo en ausencia de desactivador, τ_0 :

$$K_D = k_q \tau_0 \quad 3.5$$

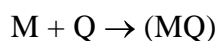
La ecuación de Stern–Volmer también se puede expresar, para la desactivación dinámica, en función de los tiempos de vida del estado excitado en ausencia y presencia del desactivador:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D [Q] \quad 3.6$$

Es precisamente esta característica la más importante a la hora de distinguir este tipo de proceso de la desactivación estática.

La desactivación dinámica está controlada por difusión y por ello dependerá de la temperatura y la viscosidad del disolvente.

Desactivación estática. Es el resultado de la formación de un complejo en estado fundamental entre el desactivador y el cromóforo, que al ser excitado no origina fluorescencia. En este proceso, el desactivador elimina una fracción de cromóforos que podrían, tras ser excitados, emitir, observándose así solo la emisión de aquellos que se encuentren de forma libre. La fracción que está no complejada no se encuentra afectada por la presencia de desactivador y por tanto, tampoco su τ , haciendo que la relación $\tau_0/\tau=1$. El proceso se puede representar como:



La desactivación estática también se puede describir por una expresión análoga a la ecuación de Stern–Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q] \quad 3.7$$

donde K_s es la constante de equilibrio del complejo formado. Esta constante de equilibrio también depende de la temperatura, pero generalmente no de la viscosidad del medio.

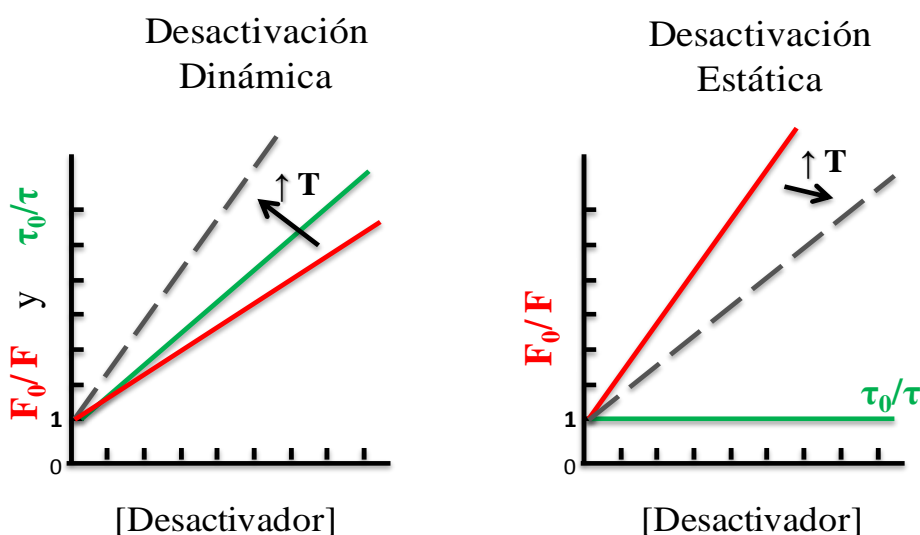


Figura 3.2. Comparación desactivación dinámica y estática.

Es importante señalar, que aunque los dos procesos de desactivación, dinámico y estático, dependen de la temperatura, su relación es bien distinta (Figura 3.2). Por un lado, la desactivación dinámica es un proceso controlado por la difusión de las especies que colisionan, por ello, al aumentar la temperatura, aumentarán los coeficientes de difusión y del mismo modo, la constante de desactivación bimolecular. Por el contrario en la desactivación estática, un aumento de la temperatura supone una disminución de la estabilidad del complejo MQ, produciendo una disminución en el valor de la constante K_S .

Desactivación estática y dinámica combinada. En muchos casos el cromóforo puede sufrir un proceso de desactivación dinámica y estática por el mismo desactivador. Este hecho da lugar a desviaciones positivas en la ecuación de Stern–Volmer obteniéndose una ecuación de segundo orden con respecto a la concentración del desactivador.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad 3.8$$

La representación de F_0/F frente a $[Q]$, de acuerdo con la ecuación anterior, no es lineal, pero a partir de ella puede obtenerse la fracción de desactivación dinámica por medidas de tiempos de vida, ya que en cualquier caso, para el proceso dinámico, debe cumplirse la Ecuación 3.6.

3.3.2 Formación de excímeros y exciplejos

Los *excímeros* son dímeros en el estado excitado (el término viene del inglés *excimer*: “**exc**ited **di**mer”). Se forman mediante la interacción de una molécula en el estado excitado y otra idéntica en el estado fundamental.



Por el contrario, un *exciplejo* es un complejo, también estable en el estado excitado (del inglés, *exciplex*: “**exc**ited **com**plex”), pero formado por la interacción de una molécula excitada y otra diferente en el estado fundamental.

La formación de excímeros se puede dar tanto en moléculas aromáticas aisladas que contienen un solo cromóforo a relativas altas concentraciones, como en sistemas

que contengan múltiples grupos aromáticos, pudiendo ser en este último caso, inter- o intramoleculares. Que se dé uno u otro tipo dependerá de la concentración, en caso de los excímeros intermoleculares, de la organización de los cromóforos y de la dinámica de la molécula que une los mismos, en el caso de los excímeros intramoleculares.

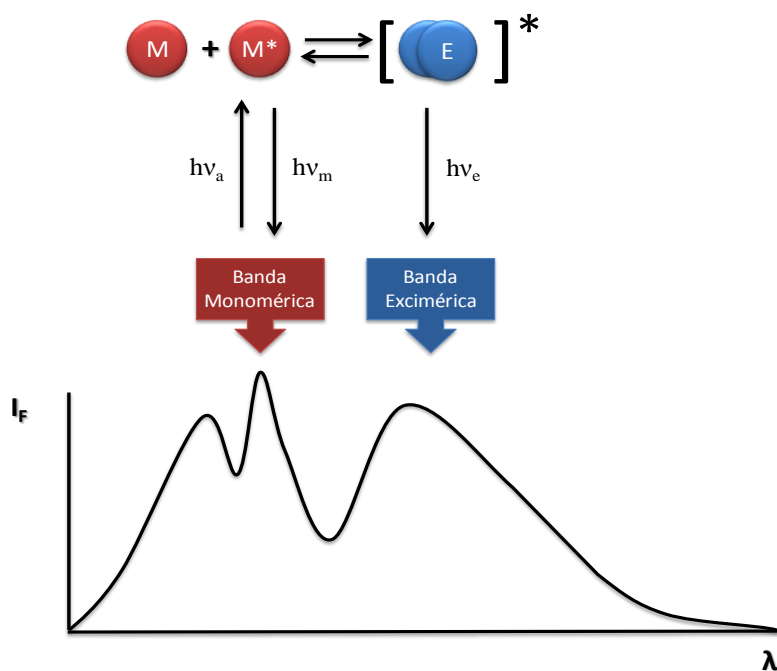


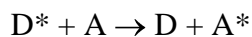
Figura 3.3. Formación de excímeros indicando la banda monomérica y excimérica.

Una forma de estudiar este tipo de complejos es mediante el espectro de emisión. La emisión del excímero da lugar a una nueva banda situada a mayor longitud de onda con respecto a la banda de emisión monomérica, tal y como indica la Figura 3.3. Esto es debido a que el tránsito espectroscópico para el dímero tiene menor contenido energético que el mismo tránsito para un cromóforo aislado. Además, cuanto menor sea la diferencia energética entre ambas bandas, menor será la estabilidad del excímero.

Para que se formen excímeros se deben cumplir una serie de condiciones estructurales, según las cuales ambos cromóforos deben adoptar una estructura tipo "sándwich-plana", que implica un máximo solapamiento de orbitales π , situándose ambos a una distancia entre 3-4 Å aproximadamente. En esta característica radica su importancia desde el punto de vista estructural. Su formación es un proceso exotérmico y controlado por difusión, por lo que a temperaturas relativamente altas se favorece la disociación de los dímeros formados. La viscosidad y la presión también son parámetros importantes en el proceso de formación de los excímeros.

3.3.3 Transferencia de energía electrónica

La transferencia o migración de la energía electrónica es un proceso de desactivación del estado excitado que implica la cesión de la energía desde una molécula excitada electrónicamente D^* , dadora, a otra molécula A, aceptora, según el siguiente proceso:



Los estados implicados en la transferencia de energía son los niveles electrónicos excitados de A y D, lo que hace que el mecanismo sea diferente al fenómeno de desactivación bimolecular. Las moléculas A y D pueden ser iguales o diferentes y la transferencia puede producirse entre cromóforos unidos a la misma molécula, intramolecular, o que estén situados en diferentes moléculas, intermolecular.

La transferencia de energía puede ocurrir por diferentes mecanismos. La interacción entre cromóforos puede ser culómbica (tipo Förster) o por solapamiento de orbitales intermoleculares (tipo Dexter). De los dos mecanismos, el de tipo Förster es el más abundante y el que ofrece un mayor interés debido al gran número de aplicaciones, por ejemplo, en el análisis de ADN, diagnósticos médicos o en microscopía de fluorescencia, entre otros.^{2,6} Este proceso es debido a interacciones por resonancia de tipo dipolo–dipolo de largo alcance. La eficiencia del proceso depende del solapamiento entre el espectro de emisión de D y el espectro de absorción de A, de la orientación relativa entre A y D y de la distancia entre ambos. Son precisamente estas dos últimas características las que lo hacen potencialmente útil para el análisis conformacional y estructural.⁷

Para un sistema particularmente sencillo constituido por un dador D y un aceptor A separados por una distancia fija R, la constante de velocidad de transferencia de energía por resonancia, k_{ET} , viene dada por la ecuación de Förster:

$$k_{ET} = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A R^6 \tau_D} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 3.9$$

donde ϕ_D y τ_D es el rendimiento cuántico y el tiempo de vida, respectivamente, de D en ausencia de A, n es el índice de refracción del medio, N_A es el número de Avogadro, R es la distancia entre D y A, $F_D(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia normalizada a la unidad de D corregida en el intervalo de longitudes de ondas desde λ a $\lambda+d\lambda$ y $\varepsilon_A(\lambda)$ es

el coeficiente de absorción molar de A en función de λ . κ^2 se denomina factor orientacional y describe la orientación relativa en el espacio de los momentos de la transición de emisión de D y de absorción de A. Dicho factor viene dado por la expresión:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3 \cdot \cos\theta_D \cdot \cos\theta_A)^2 \quad 3.10$$

siendo θ_T el ángulo entre el momento de la emisión del dador y el momento de la absorción del aceptor, y θ_D y θ_A los ángulos entre dichos momentos y el vector que une los centros del dador con el aceptor, respectivamente. Dependiendo de la orientación relativa entre D y A, κ^2 puede variar entre 0 y 4. Sin embargo en el caso de cromóforos aislados orientados al azar toma el valor de 2/3.

La distancia entre D y A a la cual la velocidad de transferencia de energía, k_{ET} , es igual a la velocidad de desactivación del dador por otras vías en ausencia del aceptor, es decir, $k_{ET} = \tau_D^{-1}$, se denomina *radio de Förster*, R_0 . En otras palabras, R_0 es la distancia a la cual la transferencia de energía es un 50% eficaz y por tanto, la emisión del dador disminuye a la mitad con respecto a la intensidad en ausencia del aceptor.⁷

Normalmente en un experimento de transferencia de energía se suele hablar en términos de distancia más que en velocidades de transferencia. Por esta razón, la Ecuación 3.9 puede escribirse en términos de radio de Förster:

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 3.11$$

Una vez conocido el valor R_0 , la velocidad de transferencia de energía es fácil calcularla a través de la expresión:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad 3.12$$

3.4 Fluorescencia aplicada a ciclodextrinas

Cualquier método físico o químico que pueda seguir el cambio de una propiedad del sistema cuando se varía la composición del mismo, puede ser utilizado para estudiar las constantes de formación, la estequiometría, los parámetros termodinámicos, etc., de complejos supramoleculares.¹⁰ Entre las técnicas más empleadas se encuentran las espectroscopias de UV-visible,¹¹ fluorescencia,^{1,12} dicroísmo circular,^{13,14} de resonancia magnética nuclear (RMN),¹⁵ microcalorimetría,^{16,17} técnicas cromatográficas,^{18,19} etc.^{20,21} La elección del método, muchas veces, viene dado por la disponibilidad de técnica y las características del sistema estudiado.

El estudio de complejación de CD por fluorescencia tiene muchísimas ventajas. Debido a la alta sensibilidad de la técnica, se pueden estudiar sistemas con constantes de asociación (K) bastante elevadas, pudiéndose determinar valores de K de hasta 10^7 M^{-1} . Generalmente, la técnica de RMN permite medir constantes de equilibrio $K < 10^4 \text{ M}^{-1}$ y las de UV-Vis o dicroísmo circular estos valores están comprendidos entre $10^2 < K < 10^4 \text{ M}^{-1}$.¹² Además, cuando se produce la complejación, las propiedades fluorescentes suelen cambiar en mayor medida que otras propiedades espectroscópicas.

El interior de la cavidad de las CDs es bastante más hidrofóbico que el exterior acuoso, lo que puede llevar a cambios en las propiedades fluorescentes de cualquier cromóforo que penetre en su interior durante la complejación, tanto si se encuentra de forma libre, como si está unido covalentemente a otro sistema (polímeros, ciclodextrinas, etc.). Los cambios que se originan pueden ser: desplazamiento de la longitud de onda del máximo de excitación o de emisión (cambio de color), en la intensidad de fluorescencia, en su rendimiento cuántico, en el tiempo de vida medio, en la polarización de la emisión, etc. Normalmente suele producirse un desplazamiento hacia longitudes de onda menores y un aumento en la intensidad con la complejación, pero no es siempre el caso. El efecto y los factores que son responsables de este cambio van a depender del tipo de CD, de la molécula huésped, del medio en que se encuentre, temperatura, etc. En general, los agentes que generan estos cambios fotofísicos son:

1. El microentorno que rodea a la sonda fluorescente en el interior de la CD es menos polar y más viscoso que la disolución acuosa.
2. La disminución en la libertad de movimiento del cromóforo.
3. Las interacciones huésped-disolvente.

4. La protección de la molécula huésped frente a desactivadores moleculares.

Todos estos factores permiten estudiar tanto procesos de inclusión de un cromóforo libre en una CD; de auto-inclusión, si el cromóforo se encuentran unido covalentemente a la CD; como de auto-asociación de CDs modificadas con cromóforos en dímeros u otras estructuras supramoleculares más complejas.¹²

3.5 Referencias

- (1) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Nueva York, 2008.
- (2) Lakowicz, J. R.; Editor *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 3: Biochemical Applications*; Plenum, 1992.
- (3) Gell, C.; Brockwell, D.; Smith, A. *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*; Oxford University Press: Oxford, 2008.
- (4) Resch-Genger, U. *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I: Techniques.*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2008.
- (5) Lakowicz, J. R. Novel Fluorophores. En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer: Nueva York, 2008; pp 675.
- (6) Valeur, B. *Molecular Fluorescence*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- (7) Rabek, J. F. *Mechanics of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers: Theory and Applications.* ; John Wiley & Sons.: Chichester, 1987.
- (8) Levine, I. N. *Fisicoquímica*; McGrawHill, 2004; Vol. 2.
- (9) Lakowicz, J. R.; Editor *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 2: Principles*; Plenum, 1991.
- (10) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875.
- (11) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N.; Martin, M. M. Photophysics and Photochemistry of Supramolecular Systems. En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Schalley, C. A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; pp 220.
- (12) Douhal, A. *Cyclodextrins Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology* Elsevier: Amsterdam, 2006.
- (13) Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R. W.; Editors *Circular Dichroism: Principles and Applications*; VCH, 1994.

- (14) Hembury, G. A.; Borovkov, V. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1.
- (15) Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Ruediger, V.; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1755.
- (16) Schmidtchen, F. P. Calorimetry: An indispensable tool in the design of molecular hosts. En *Macrocyclic Chemistry: Current Trends and Future Perspectives* Gloe, K., Ed.; Springer, 2005; Vol. 19; pp 291.
- (17) Schmidtchen, F. P. Isothermal titration calorimetry in supramolecular chemistry. En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Schalley, C. A., Ed.; Wiley-VCH Weinheim, 2007; pp 55.
- (18) Cserhati, T. Cyclodextrins in HPLC. En *Encyclopedia of Chromatography*; 3^o ed.; Cazes, J., Ed.; CRC Press, 2010; Vol. 1; pp 546.
- (19) Cserhati, T. Cyclodextrins in GC. En *Encyclopedia of Chromatography*; 3^o ed.; Cazes, J., Ed.; CRC Press, 2010; Vol. 1; pp 536.
- (20) Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- (21) Schalley, C. A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2008.

Fundamentos de Dicroísmo Circular

4.1 Introducción

Un método ampliamente utilizado para detectar y analizar la quiralidad consiste en la determinación de la actividad óptica mediante la técnica de Dicroísmo Circular (DC o también conocido por sus siglas en inglés CD, *Circular Dichroism*). La importancia de esta técnica reside en que, por una parte, ofrece una *observación quiral*, es decir, consigue responder a la pregunta de si un sistema es quiral o no. Por otra, sirve como *medida quiral*, proporcionando información de gran valor acerca del tipo de transición espectroscópica que se produce y dando indicios de cómo va a ser la configuración absoluta de moléculas que tengan quiralidad conformacional o configuracional, sobre la elipticidad de cristales líquidos o películas poliméricas, con quiralidad molecular o supramolecular, etc.¹

El DC se puede emplear en numerosos campos de la química, por ejemplo, en bioquímica, la mayoría de moléculas (ácidos nucleídos, proteínas, lípidos, hormonas, vitaminas...) son quirales y dan señal de DC, pero además sus estructuras secundarias y terciarias presentan espectros de dicroísmo circular característicos y específicos.² En química analítica se usa como método espectroscópico de reconocimiento de “huella dactilar” para una amplia variedad de sistemas. Una de las herramientas más importantes para la investigación estereoquímica es el acoplamiento de HPLC con DC, ya que une la sensibilidad y selectividad de las técnicas cromatográficas con la información estereoquímica que el DC aporta.³ Por otro lado, se ha convertido poco a poco en una herramienta fundamental en el campo de la química inorgánica, incluyendo asimismo, la reciente química bioinorgánica. Esta técnica proporciona de forma rápida y detallada información, no solo sobre el origen electrónico de la actividad óptica, sino también ayuda a comprender cómo va a ser la estructura de compuestos, sin necesidad de recurrir a la compleja técnica de difracción de rayos X. Además, es imprescindible para estudiar las interacciones con moléculas quirales, la estereoselectividad y estereoespecificidad de compuestos de coordinación. Trabajos recientes se han centrado en interacciones de complejos metálicos quirales o aquirales con macromoléculas quirales de origen biológico, como el ADN y las proteínas, principalmente.⁴ En química orgánica, numerosos métodos de DC se han utilizado en el desarrollo de reglas útiles para establecer las configuraciones absolutas de una amplia variedad de compuestos.⁵ Por ejemplo: la llamada regla del octante (*Octant Rule*), se emplea para el estudio de alquil

ketonas o aldehídos saturados; para enantiómeros que contengan anillos bencénicos (*Benzene Sector* y *Benzene Quirality Rules*); para estudiar la quiralidad en moléculas con dienos, compuestos aromáticos S-sustituídos, sistemas *twisted π* -electrónicos, etc.^{5,6}

Es importante destacar que no siempre la señal obtenida por DC es debida a un grupo quiral, sino que se puede inducir en diversos tipos de sistemas que no tienen elementos ópticamente activos. Este fenómeno se conoce como Dicroísmo Circular Inducido (DCI o ICD por sus siglas en inglés *Induced Circular Dichroism*). Existe un elevado número de compuestos que poseen dicha característica, como por ejemplo, algunos polímeros aquirales cuando se encuentran en presencia de pequeñas moléculas quirales, muestran DCI. Las interacciones no covalentes entre el polímero y dichas moléculas provocan un cambio estructural, produciendo la formación de una hélice orientada mayoritariamente hacia un sentido, y por tanto, dando lugar a una señal dicroica.⁷ Además, no solamente se da en polímeros sintéticos, sino también en sistemas biológicos, como por ejemplo el ADN. Los derivados de porfirinas aquirales dan una señal de dicroísmo circular inducido que depende de la naturaleza del ion central, la localización y el tipo de sustituyente de su periferia, así como de la secuencia de bases del ADN con las que interactúe.¹

4.2 Fundamentos de Dicroísmo Circular

Según la teoría electromagnética, una radiación electromagnética está formada por un campo eléctrico \vec{E} y uno magnético \vec{B} , iguales, perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación que vibran en fase. Para caracterizar una radiación basta con determinar uno de los dos vectores \vec{E} o \vec{B} , puesto que, conocido uno de ellos, sabemos que existe el otro con las características que acabamos de mencionar.

La longitud de onda, λ , se define como la distancia recorrida por la radiación durante la oscilación completa de \vec{E} (\vec{B}), por ejemplo, la separación entre dos máximos consecutivos de la onda asociada a cada uno de estos vectores. Llamamos plano de polarización de una radiación al plano en el que tiene lugar la oscilación del vector \vec{E} (\vec{B}).⁸

Podemos considerar una radiación polarizada en un plano como la resultante de dos ondas circularmente polarizadas, una a la derecha (R) y otra hacia la izquierda (L) de igual intensidad. Cuando la radiación en el plano atraviesa la materia puede ocurrir que ésta absorba una parte de ella. En este caso la intensidad transmitida I_t es distinta de la

intensidad incidente I_0 , pudiéndose caracterizar la magnitud de absorción por el coeficiente de absorción molar, ϵ , constante de proporcionalidad que aparece en la ley de la Lambert-Beer y que relaciona la absorbancia con la longitud de muestra atravesada por la radiación (d) y su concentración molar (c) (Capítulo 2, Ecuación 2.4).

Cuando este fenómeno ocurre, pueden darse dos casos:

1. Que la muestra absorba por igual la componente R y la L, o dicho con otras palabras, que los coeficientes de extinción molar sean iguales para los dos sentidos $\epsilon_R = \epsilon_L$. En estas condiciones, la radiación transmitida tiene la misma intensidad en R que en L (aunque su intensidad total sea distinta que la radiación incidente) por lo que la radiación está polarizada en un plano, Figura 4.1 (a).

2. Que la muestra absorba más una de las componentes que la otra, es decir, $\epsilon_R \neq \epsilon_L$. En estas circunstancias, las componentes R y L de la radiación transmitida tienen distinta intensidad, por lo que la resultante describe una elipse, dando lugar a una radiación elípticamente polarizada. Decimos entonces que esta muestra presenta *dicroísmo circular*, tal y como se muestra en la Figura 4.1 (b).

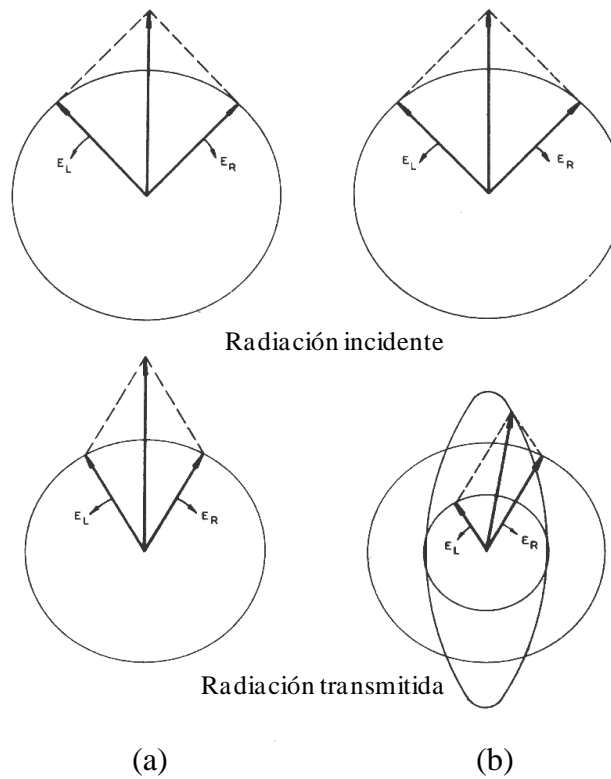


Figura 4.1. Radiaciones incidente y transmitida por una muestra, donde $\epsilon_R = \epsilon_L$ (a) y $\epsilon_R \neq \epsilon_L$ (b).

A una longitud de onda dada, se define ΔA como la diferencia entre la absorbancia de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha:

$$\Delta A = (A_L - A_R)_\lambda \quad 4.1$$

La Ecuación 4.1 puede ser expresada aplicando la ley de Lambert-Beer, como:

$$\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R)_\lambda d c \quad 4.2$$

que se puede redefinir como:

$$\Delta \epsilon = (\epsilon_R - \epsilon_L)_\lambda \quad 4.3$$

La Ecuación 4.3 se conoce como *dicroísmo circular molar*. Por razones históricas muchas de las medidas se expresan como grados de *elipticidad*, θ , definiéndose como:

$$\theta_\lambda = \arctan(b/a) \quad 4.4$$

donde a y b son los ejes mayor y menor de la elipse de la radiación transmitida, respectivamente. θ , es función de la concentración de soluto y del paso de luz. Esta dependencia puede ser eliminada tal y como se indica en la Ecuación 4.5, obteniendo lo que se define como *elipticidad molar*, $[\theta]$.

$$[\theta]_\lambda = 100 \theta / (d c) \quad 4.5$$

La diferencia de coeficientes de extinción molar, $\Delta \epsilon$, y la elipticidad molar, $[\theta]$, están relacionadas mediante la expresión:

$$[\theta]_\lambda = 3298.2 \Delta \epsilon \quad 4.6$$

Se dice que el dicroísmo es positivo cuando $\Delta\epsilon_\lambda > 0$ y negativo en caso contrario. Es importante indicar que tanto θ , como $[\theta]$ y $\Delta\epsilon$ dependen de la longitud de onda de la radiación, λ , utilizada. Una representación gráfica de cualquiera de ellas (todas son proporcionales entre sí) frente a λ , constituye el espectro de dicroísmo circular.⁹ La Tabla 4.1 resume las magnitudes más utilizadas en la espectroscopia de DC con sus respectivas unidades.¹⁰

Tabla 4.1. Magnitudes y unidades usadas en DC.

Nombre de la magnitud	Definición	Unidades
Diferencia de Absorbancia	$\Delta A = (A_L - A_R)_\lambda$	Adimensional
Dicroísmo Circular Molar	$\Delta\epsilon = (\epsilon_L - \epsilon_R)_\lambda = \Delta A / (d \cdot c)$	$L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$
Elipticidad	$\theta_\lambda = \arctang(b/a)$	Deg ó mdeg
Elipticidad Molar	$[\theta]_\lambda = 100 \theta / (d \cdot c)$	$Deg \cdot cm^2 \cdot d mol^{-1}$

4.3 Acoplamiento Excitónico

El método de Acoplamiento Excitónico (AE) es una herramienta simple y extremadamente útil para establecer las configuraciones y conformaciones de compuestos en disolución a escala del microgramo.

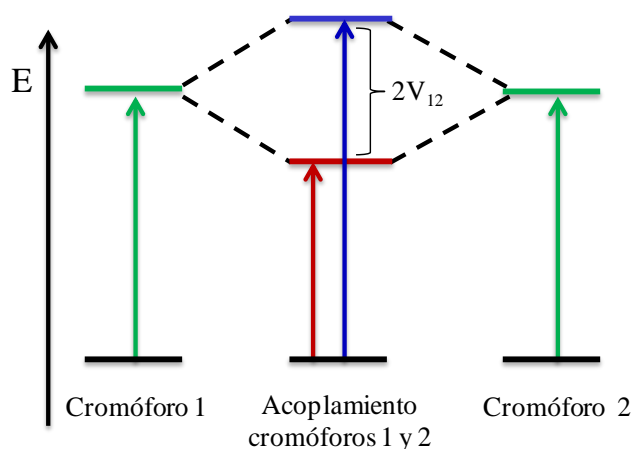


Figura 4.2. División de los niveles energéticos excitados a partir del acoplamiento de dos cromóforos aislados.

Cuando dos (o más) cromóforos, con altos coeficientes de absorción molar, están próximos en el espacio y constituyen un sistema quiral, sus momentos de la transición electrónica interactúan haciendo que los estados excitados se dividan en dos niveles de energía, separados $2V_{12}$ denominada *Separación Davydov* (Figura 4.2). Como resultado se producen cambios en el

espectro de absorción UV-Vis y, sobre todo en el de dicroísmo circular, tal y como muestra la Figura 4.3. Los dos cromóforos implicados pueden ser iguales o diferentes e incluso no es necesario que estén unidos a la misma molécula para que interactúen.

El AE se muestra en el espectro de UV-Vis como una sola señal de una intensidad mayor, aproximadamente el doble, que la que mostrarían los cromóforos aislados. No obstante, si la diferencia de energía entre los dos niveles del acoplamiento fuera lo suficientemente grande, podrían observarse dos máximos separados. En el espectro de DC por el contrario, aparece una banda positiva y otra negativa bien diferenciadas. Si la quiralidad de la transición tiene el sentido de las agujas de reloj, aparecerá a mayor longitud de onda una banda positiva y a menor una negativa. Esta disposición de las bandas se define como AE *positivo*, y si se da al contrario, se establece como AE *negativo*. No hay ninguna excepción a la asignación de signos en la señal doble de dicroísmo circular y la quiralidad con la que se disponen los cromóforos: disposiciones quirales positivas y negativas dan señales de AE positivas y negativas respectivamente.

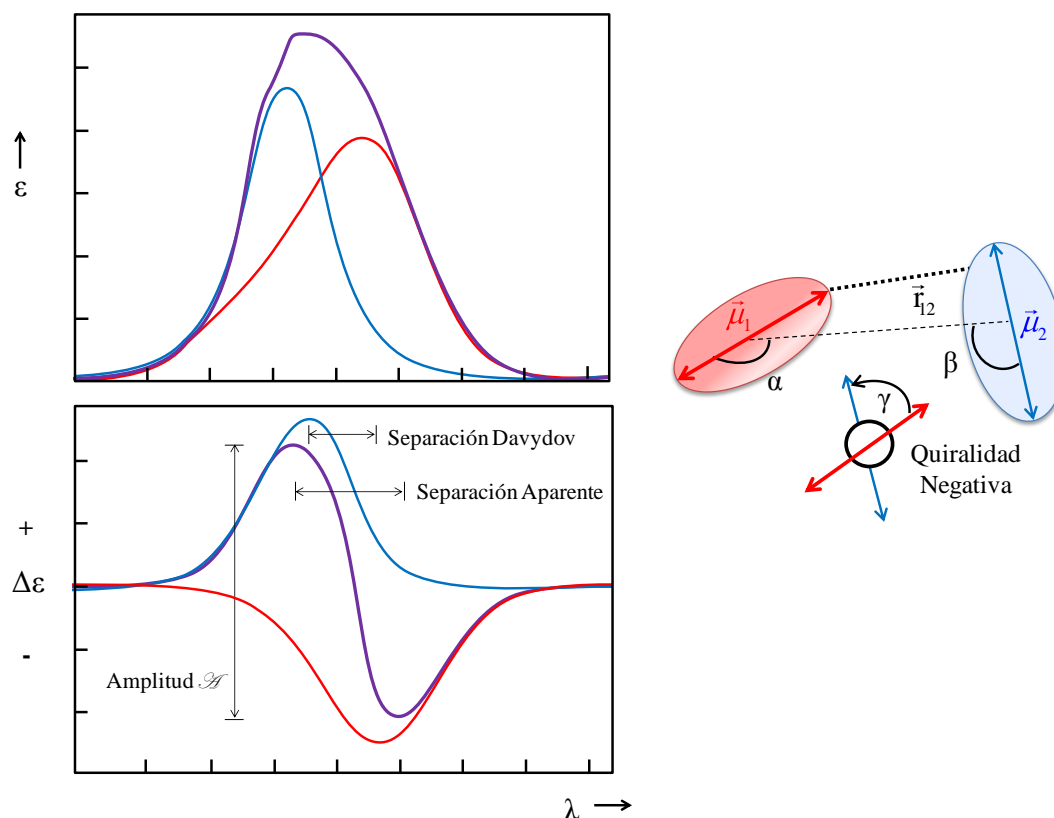


Figura 4.3. (Derecha) Espectro UV-Vis (superior) y de dicroísmo circular (inferior) que se produce en caso de AE: las líneas en azul y rojo representan las curvas componentes de las dos transiciones excitónicas y la línea en morado, el espectro resultante observado. La amplitud (\mathcal{A}) y la separación Davydov ($\Delta\lambda$) están indicadas. (Izquierda) Disposición geométrica de dos cromóforos necesaria para dar AE negativo.

Los espectros de dicroísmo circular de AE se caracterizan por dos parámetros:

a) La *Amplitud*, \mathcal{A} , es la intensidad total de ambas bandas medida desde el mínimo al máximo de la curva. Se considera que la amplitud es positiva (negativa) si el signo de la banda que aparece a mayor longitud de onda es positivo (negativo).

b) La *Separación Davydov*, $\Delta\lambda$ (en honor al físico teórico que desarrolló toda la teoría de AE^{11,12}) se define como la distancia, en longitud de onda, entre los máximos de las curvas de las dos transiciones excitónicas de signo contrario que componen el espectro de AE. Cabe señalar que no se refiere a la distancia en longitud de onda entre el máximo y el mínimo de la curva, aunque su valor es muy próximo.

4.3.1 Propiedades y aspectos prácticos

El AE depende de una serie de propiedades del sistema que van a ayudar a la caracterización del mismo. Entre éstas destacan:

Relación de aditividad

La amplitud de un sistema que contiene tres o más cromóforos iguales, se puede aproximar a la suma de la interacción de los cromóforos dos a dos. Esto quiere decir que la \mathcal{A} observada para un sistema con tres cromóforos idénticos (definidos por 1, 2 y 3), se aproximará a la suma de los tres pares de cromóforos, según muestra la Ecuación 4.7:

$$\mathcal{A}_{\text{TOTAL}} = \mathcal{A}_{1,2} + \mathcal{A}_{2,3} + \mathcal{A}_{1,3} \quad 4.7$$

Coefficiente de absorción molar, ϵ

La amplitud y ϵ tienen una dependencia lineal. No obstante a altas ϵ , la dependencia pasa a ser cuadrática (ϵ^2) y \mathcal{A} aumenta en mayor medida, haciendo que los resultados sean más sensibles. Por esta razón, cuando disponemos de cromóforos con coeficientes de absorción molar altos, solo unos pocos microgramos son necesarios para llevar a cabo el estudio de AE.

Momento de la transición electrónica, μ

Para el análisis de configuraciones absolutas basadas en el signo del AE, es necesario saber el giro que disponen los momentos de las transiciones electrónicas de los

cromóforos. Es recomendable, por tanto, conocer las direcciones de dichos momentos electrónicos y las longitudes de onda a las que se aparecen sus transiciones electrónicas.

Distancia intercromofórica

\mathcal{A} es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia intercromofórica aunque es muy importante destacar que ϵ tiene una gran influencia en la distancia máxima a la que se puede dar AE. Por ejemplo, en p-benzoatos o 2-naftoatos, la separación entre cromóforos máxima para observar AE tiene que ser de entre 6 y 7 Å, mientras que para los 2- o 9-derivados de antraceno, puede llegar hasta 10 Å; incluso se puede detectar a una distancia de 40-50 Å en el caso de las porfirinas.

Dependencia angular

Tanto la intensidad, como el signo de la \mathcal{A} están relacionados con la orientación de los cromóforos, que depende de la configuración y la conformación molecular. Este factor es función de los tres ángulos α , β y γ indicados en la Figura 4.3. De forma general, no hay AE cuando el ángulo γ es 0° ó 180° .

4.4 Dicroísmo Circular aplicado a ciclodextrinas

La técnica de DC resulta valiosa en fenómenos de inclusión donde la molécula huésped es no quiral y la molécula anfitrión es quiral. El dicroísmo circular tiene la gran ventaja de que, además de permitir calcular parámetros cuantitativos, da información cualitativa sobre la estructura tridimensional del complejo formado.¹³

4.4.1 Tipos de Dicroísmo Circular para complejos con ciclodextrinas

Las CDs, a pesar de ser compuestos quirales, no absorben en el intervalo de longitudes de onda que comprende el ultravioleta-visible (200-1000 nm) y por tanto, no muestran ninguna señal de DC. No obstante, las CDs pueden inducir intermolecularmente una señal de dicroísmo circular en compuestos aquirales, siempre y cuando éstos contengan un grupo cromóforo que absorba en dicha parte del espectro. Este fenómeno, que se representa esquemáticamente en la Figura 4.4, es lo que se conoce como Dicroísmo Circular Inducido (DCI). La presencia de señal de DC, es decir del espectro de DCI, es una forma directa de detectar la formación del complejo. Dicho espectro nos proporciona información sobre la posición y orientación que adopta el grupo dentro de la

cavidad de la CD, pero también permite obtener estequiometrías y constantes de asociación de los complejos formados, además de parámetros termodinámicos asociados a los procesos de formación, debido a que la señal de DCI es proporcional a la cantidad absoluta de especie complejada.

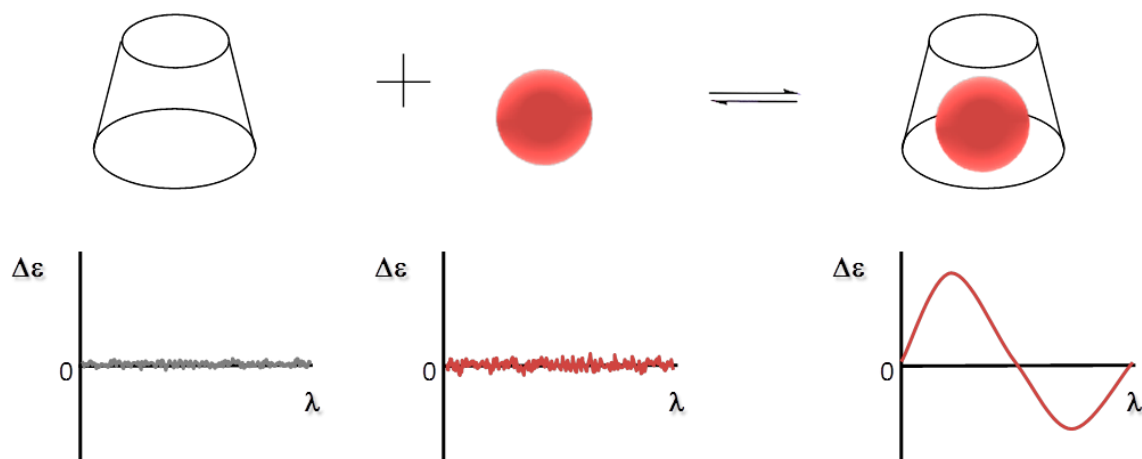


Figura 4.4. Equilibrio de asociación de una CD con un compuesto cromofórico aquiral y el espectro de dicroísmo que presenta.

Cuando las CDs disponen de un grupo cromóforo unido covalentemente, la señal dicroica obtenida se puede considerar como una señal real de DC o como DCI, ya que muchas veces sólo puede observarse si el cromóforo está intramolecularmente complejoado, es decir, si está autoincluido en la propia cavidad de la CD, tal y como muestra la Figura 4.5 (Etapa 1). En este caso, la señal de DC depende fuertemente de la conformación de la ciclodextrina, flexibilidad de la cadena que une el grupo cromóforo al macroanillo y tamaño del mismo.¹⁴ La concentración será otro factor importante a tener en cuenta, sobre todo en el caso de que tenga lugar algún proceso intermolecular que compita con el de autoinclusión. Si añadimos al sistema formado por la CD modificada, cuyo grupo se autoincluye, una molécula huésped que no contenga ningún grupo cromóforo (no absorba y por lo tanto no presente señal de DC) pero sí que se compleje fuertemente con dicha CD, se observará un descenso de la señal de DCI con la concentración de dicho huésped. Este hecho se debe al desplazamiento del cromóforo del interior de la ciclodextrina, tal y como muestra la Etapa 2 de la Figura 4.5.

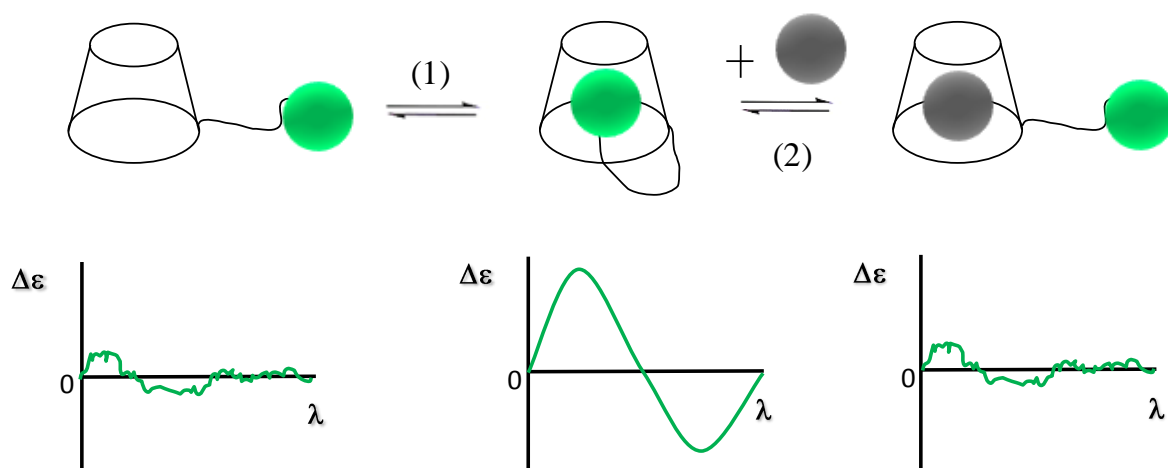


Figura 4.5. Equilibrio de asociación de una CD modificada covalentemente con un grupo cromofórico en ausencia (1) y en presencia (2) de una molécula no cromofórica y el espectro de dicroísmo que presenta.

La complejación con compuestos quirales forma diastereoisómeros, por lo que las constantes de formación sólo pueden ser calculadas si la molécula huésped es enantioméricamente pura. Si únicamente hay un tipo de cromóforo, éste por sí mismo ya muestra DC, pero su espectro puede verse alterado en mayor o menor medida, dependiendo de la complejación con la CD, como se indica en la Figura 4.6. Nótese que este caso difiere del DCI donde la ausencia de formación de complejo se corresponde con la línea cero del espectro de DC.

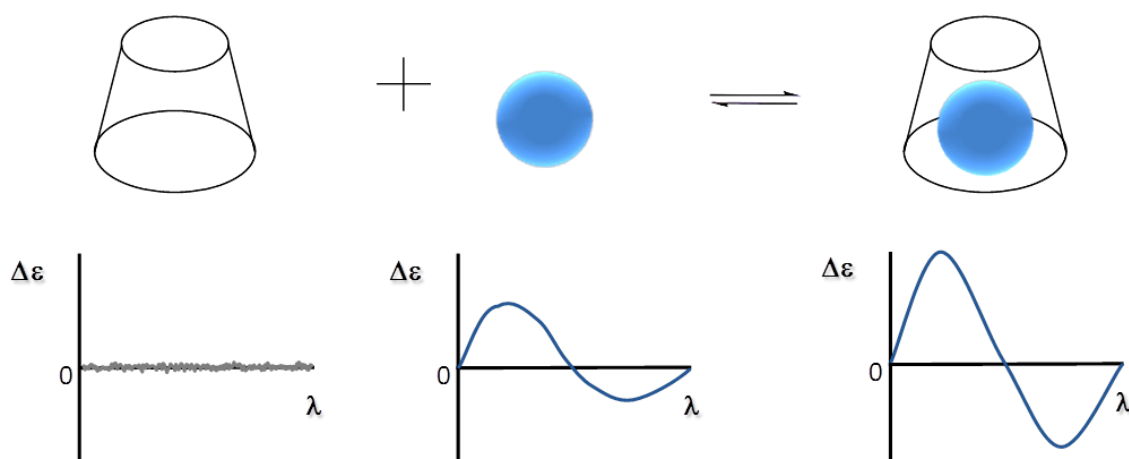


Figura 4.6. Equilibrio de asociación de una CD con un grupo cromóforo quiral enantioméricamente puro y el espectro de dicroísmo que presenta.

Cuando la molécula huésped presenta un rápido equilibrio entre sus dos formas enantioméricas, se puede emplear esta técnica para observar si existe algún tipo de discriminación quiral, es decir, alguna preferencia por uno de los dos enantiómeros durante la complejación, Figura 4.7. Este proceso nos da información acerca de la diferencia entre las constantes de asociación para las dos especies enantioméricas que se interconvierten rápidamente. El DC y DCI observado muestra la forma en que se produce la complejación, ya que la diferencia entre los espectros está relacionada con la diferente cantidad de cada tipo de enantiómero y diastereoisómero presente en la muestra, lo que nos permite obtener una constante de discriminación.

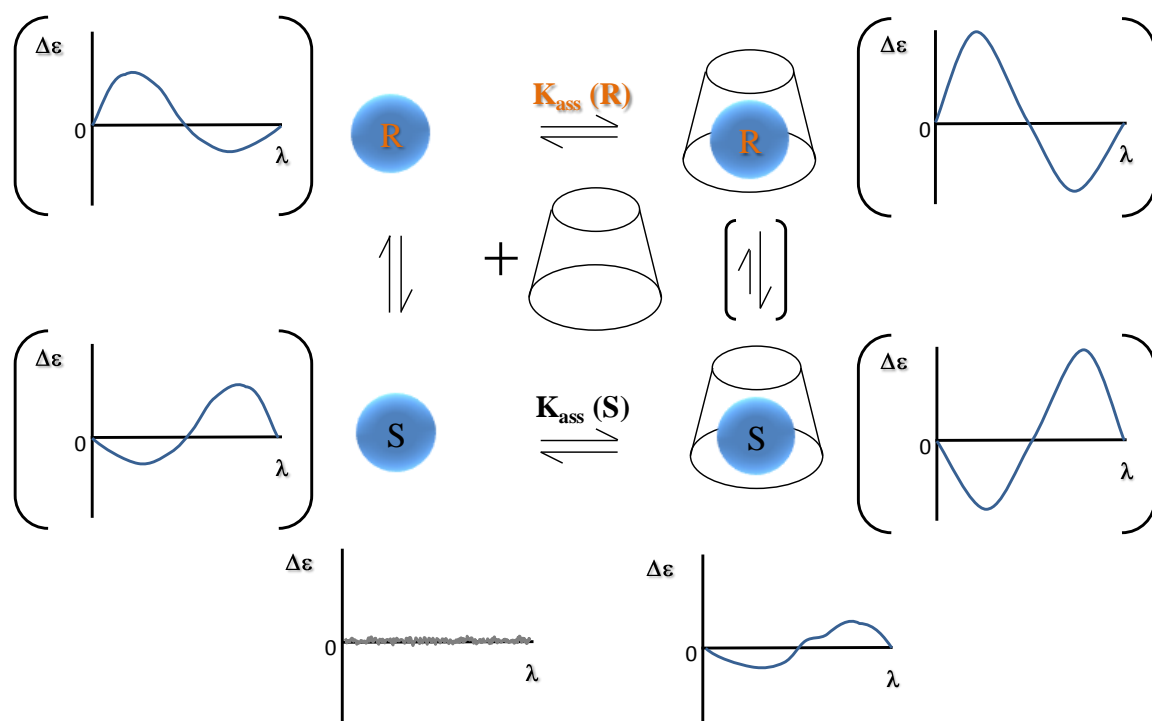


Figura 4.7. Equilibrio de asociación de una CD con un grupo cromóforo quiral cinéticamente lábil y el espectro de dicroísmo que presenta.

4.4.2 Aplicaciones de Dicroísmo Circular para la caracterización de complejos con ciclodextrinas

La espectroscopía de DC puede proporcionar dos tipos de información:

- La señal obtenida cambia con la complejación del cromóforo, por lo que se pueden determinar la estequiometría y las constantes de formación, empleando esta

dependencia que existe entre la concentración de cromóforo o ciclodextrina y la intensidad de la señal que se produce.

- El signo y la intensidad de las bandas del espectro de DC, sobre todo cuando se emplean cromóforos no quirales (DCI), dependen fuertemente de la geometría del complejo, lo que va a permitir tener una visión de la estructura del sistema (complejo, dímero, autoasociado, etc.) formado.

Junto con técnicas de NOESY y ROESY RMN, el método de DCI puede proporcionar información de la estructura tridimensional de sistemas en disolución de manera más sencilla. Al contrario que estas técnicas de RMN, el DCI no requiere de disolventes deuterados, la simple aparición de una banda del espectro ya indica la formación del complejo, siendo por tanto una medida absoluta y directa. Además, la señal no va a depender de que la molécula sea paramagnética o diamagnética y, por supuesto, las técnicas de RMN nunca darán información quiral, siendo imposible diferenciar entre enantiómeros. La difracción de rayos X es un método muy potente para determinar la estructura tridimensional de los compuestos, pero requiere que éstos cristalicen, la medida no es inmediata, se necesita un largo y exhaustivo análisis de los resultados y, además, no permite estudiar procesos en disolución, como es el caso de los fenómenos de inclusión.

4.4.3 Fundamentos teóricos de Dicroísmo Circular Inducido aplicado a ciclodextrinas

Como indicamos anteriormente, el DCI aparece como consecuencia de la complejación de una molécula anfitriona quiral y una molécula huésped aquiral. Se han propuesto diversas relaciones que muestran la dependencia existente entre la señal obtenida y la estructura del complejo formado. Los cálculos están basados en la aproximación de Kirkwood-Tinoco,¹⁵ que sugiere que el DCI está causado por las interacciones dipolo-dipolo entre el momento de la transición del huésped y los enlaces que forman parte de la molécula anfitriona quiral.¹⁶ La magnitud del dicroísmo circular se mide mediante un parámetro denominado *fuerza rotacional (R)* (en inglés *Rotational Strength*). La fuerza rotacional de la transición electrónica desde un estado fundamental (0) al estado excitado (ex) está relacionada con la elipticidad molar y en consecuencia, con el área y el signo de la banda de DC.¹ A partir de la ecuación de Kirkwood-Tinoco, Masato Kodaka dedujo una serie de reglas para macrociclos quirales en general¹⁶ y posteriormente para derivados del naftaleno aplicado a ciclodextrinas, en particular.¹⁷ Las

Ecuaciones 4.8 y 4.9 representan la dependencia de la fuerza rotacional \mathbf{R}_{0ex} con la posición del cromóforo-huésped, según la transición esté polarizada perpendicular o paralelamente al eje de simetría del macrociclo-anfitrión.

$$\mathbf{R}_{0ex} = D F(z) \quad \text{Transición paralela} \quad 4.8$$

$$\mathbf{R}_{0ex} = -D F(z)/2 \quad \text{Transición perpendicular} \quad 4.9$$

La coordenada z coincide con el eje principal de la ciclodextrina e indica la posición del centro del cromóforo según el sistema cartesiano representado en la Figura 4.8. D es un parámetro relacionado con las propiedades electrónicas y la estructura de la molécula anfitriona y las propiedades electrónicas de la molécula huésped (en el caso de las ciclodextrinas, el valor de D es negativo) y $F(z)$ representa la dependencia de \mathbf{R} con la posición de la molécula huésped con respecto a la molécula anfitriona. Sin entrar en detalles, mediante cálculos teóricos se ha deducido que, para una transición paralela, la función $F(z)$ es igual a 0 cuando $z = \infty$ y $z = -\infty$ y tiene un mínimo negativo dentro de la cavidad y dos máximos positivos cuando se encuentra cerca de sus caras pero fuera de la misma. $F(z)$ es mayor cuando el cromóforo se encuentra localizado en el extremo estrecho (cara primaria) que cuando se sitúa en la parte más ancha (cara secundaria) de la cavidad. En una transición perpendicular, el dicroísmo circular inducido ideal que debe obtenerse es $-1/2$ de los valores obtenidos para la transición paralela.

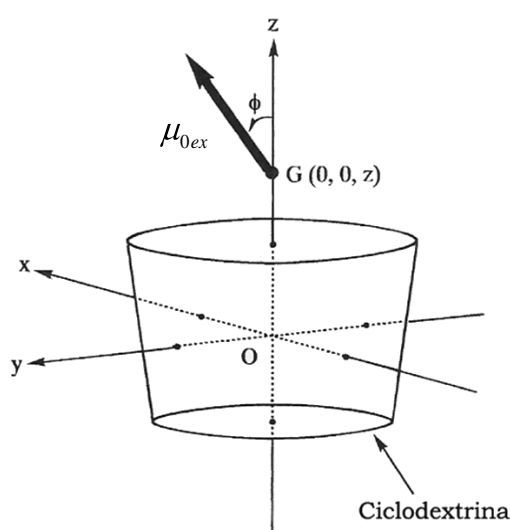


Figura 4.8. Modelo del cono truncado. G y μ_{0ex} representan la posición y el momento de la transición electrónica de la molécula huésped, respectivamente.

Una forma más general de resumir estas expresiones se muestra en la Ecuación 4.10:

$$R_{0ex} = D F(z) (3 \cos^2 \phi - 1) / 2 \quad 4.10$$

el valor de ϕ representa el ángulo que forman el eje z (o eje principal de la ciclodextrina) con el vector del momento de la transición de la molécula huésped. La Ecuación 4.10 indica que el signo del DCI depende de la posición (z) y la dirección (ϕ) del momento de la transición del cromóforo-huésped.

Teniendo en cuenta las ecuaciones anteriores, se pueden deducir las siguientes reglas:

- a) Si el cromóforo se encuentra en el interior de la cavidad de la ciclodextrina y el momento de la transición electrónica con respecto al eje de la CD es paralelo (perpendicular), la señal de DC es positiva (negativa).
- b) El signo del DCI se invierte cuando el huésped se encuentra fuera de la cavidad.
- c) La magnitud del DCI es mayor si el huésped está situado en la parte más estrecha que cuando se dispone en la parte más ancha de la cavidad.¹⁸
- d) El valor del DCI de la transición polarizada perpendicularmente en relación al eje del macrociclo, es la mitad y de signo contrario de la que se obtendría si la transición estuviera polarizada paralelamente.

De forma experimental, también se ha descrito en la bibliografía que cuanto más sujeto esté el huésped dentro de la ciclodextrina, es decir, cuanto más impedido sea el movimiento del cromóforo en el interior de la misma, más intensa será la señal del DCI, debido a que el cromóforo experimenta fuertes interacciones con el esqueleto quiral de la CD. Por el contrario, un cromóforo que tenga un amplio movimiento en el interior de la cavidad mostrará una señal mucho más débil.¹⁹

4.5 Referencias

- (1) Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W.; Editors *Circular Dichroism: Principles and Applications*; Wiley-VCH, 2000.
- (2) Fasman, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Springer: Nueva York, 1996.
- (3) Purdie, N.; Brittain, H. G. *Analytical Applications of Circular Dichroism*; Elsevier: Amsterdam, 1994.

- (4) Kuroda, R.; Saito, Y. Circular Dichroism of Inorganic Complexes: Interpretation and Applications. En *Circular Dichroism: Principles and Applications*; Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R. W., Editors, Eds.; Wiley-VCH, 2000; pp 563.
- (5) Berova, N.; Di Bari, L.; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 914.
- (6) Lightner, D. A.; Gurst, J. E. *Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism* Wiley-VCH, 2000.
- (7) Yashima, E.; Okamoto, Y. Induced CD of Polymer. En *Circular Dichroism: Principles and Applications*; Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R. W., Editors, Eds.; Wiley-VCH, 2000; pp 521.
- (8) Espectroscopía y Fotoquímica. En *Fisicoquímica*; Levine, I. N., Ed.; McGrawHill, 2004; Vol. 2.
- (9) Tarazona, M. P.; Saiz, E. *Afinidad* **1979**, 36, 208.
- (10) Urbanová, M.; Malon, P. Circular Dichroism Spectroscopy. En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Schalley, C. A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; pp 265.
- (11) Davydov, A. S. *Zhur. Eksptl. I Teoret. Fiz.* **1948**, 18, 210.
- (12) Davydov, A. S. *Theory of Molecular Excitons*; McGraw-Hill: New York, 1962.
- (13) Krois, D.; Brinker, U. H. Circular Dichroism of Cyclodextrin Complexes. En *Cyclodextrins and Their Complexes*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008; pp 289.
- (14) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7071.
- (15) Tinoco, I., Jr. *Adv. Chem. Phys.* **1962**, 4, 113.
- (16) Kodaka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3702.
- (17) Kodaka, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 8101.
- (18) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 7186.
- (19) Krois, D.; Brinker, U. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11627.

Fundamentos y Metodología de Modelización Molecular

5.1 Introducción

La interacción entre el estudio teórico a nivel molecular y el trabajo experimental constituye una herramienta muy importante en el estudio de cualquier sistema químico. Proporcionar bases teóricas estructurales acerca de las propiedades de un sistema, hace que la teoría dé significado a los datos obtenidos de forma experimental, a la vez que cada experimento sirve para comprobar la validez de las predicciones teóricas. Todo esto hace que ambos enfoques de estudio se complementen y refuercen mutuamente.¹

La modelización molecular se desarrolló debido a la necesidad de describir las estructuras moleculares e intentar racionalizar a partir de ellas sus propiedades macroscópicas. El rango de sistemas que se pueden estudiar es muy amplio e incluye desde pequeñas moléculas, hasta aquellas que contienen miles de átomos: compuestos orgánicos, polímeros sintéticos y biológicos (oligonucleótidos, péptidos y polisacáridos), compuestos organometálicos, etc. Estos métodos permiten analizar sistemas en diferentes entornos y ver su comportamiento tanto en el vacío, como rodeadas de disolventes de diferente naturaleza. Por otro lado, además de estudiar muchas de sus propiedades en el equilibrio, gracias a la Dinámica Molecular se pueden simular las características cinéticas de un sistema.²

5.2 Mecánica Molecular

Método de Cálculo: Force Field

De entre todos los procedimientos teóricos disponibles hoy día para predecir la energía y la geometría de las moléculas, uno de los más usados habitualmente es el llamado *Mecánica Molecular* (MM).²⁻⁴ Este método emplea las leyes de la física clásica para predecir las estructuras y propiedades de las moléculas.⁵ Entre las principales ventajas destacan:

- El tiempo de cálculo que se requiere para la obtención de resultados fiables se encuentra dentro de los límites accesibles para un ordenador actual. Esto permite poder utilizarlo para estudiar sistemas que contengan un elevado número de átomos.
- No es necesario un gran conocimiento de los métodos de mecánica cuántica para entenderlo y aplicarlo.
- Los resultados obtenidos en lo que se refiere a la geometría de la molécula son en su mayoría comparables a los obtenidos por sofisticados métodos cuánticos.

En este método, la molécula se ve como una colección de puntos (átomos) unidos entre sí por muelles (enlaces) que tienen diferentes elasticidades (constantes de fuerza). Las fuerzas que unen a los átomos pueden ser descritas por funciones de energía potencial, que dependen de longitudes, ángulos e interacciones entre átomos no enlazados. La combinación de estas funciones constituye el *Campo de Fuerzas* (conocido en inglés como *Force Field*).

La idea básica del método consiste en que las moléculas vienen definidas por longitudes y ángulos de enlace naturales o estándares, más o menos generales y característicos de esa estructura. El ajuste de estos parámetros teniendo en cuenta las diferentes interacciones de tipo estérico y electrostático que puedan tener lugar entre los átomos o grupos de átomos, va a determinar la energía y la geometría de la molécula.

El procedimiento para aplicar el método de Campo de Fuerzas a una molécula, se puede resumir en tres pasos:^{3,5}

1. *Establecer las ecuaciones* necesarias, normalmente funciones de potencial de tipo empírico, para calcular la energía en función de la geometría molecular.
2. *Parametrizar* las ecuaciones. Los parámetros vienen definidos por las constantes de fuerza, valores usados en las ecuaciones que relacionan las características atómicas con la energía de los componentes y los datos estructurales, como son las distancias de enlace, los ángulos, etc.
3. Establecer los algoritmos necesarios para calcular las nuevas coordenadas atómicas, proceso que se conoce como *minimización*, o también, *optimización*.

Cálculo de la energía usando el programa Sybyl

Sybyl³ es el nombre de un paquete de programas de modelización molecular que utiliza principalmente la Mecánica Molecular y entre otros, el campo de fuerzas de Tripos (*Tripos Force Field*),⁶ como herramienta para estudios de estructuras, propiedades, análisis conformacional, etc.

La geometría utilizada por el campo de fuerzas de Tripos procede de la minimización de las estructuras cristalográficas, de las funciones de potencial y de los parámetros obtenidos de una continua evolución y adaptación de otros propuestos anteriormente^{7,8} con el fin de reproducir magnitudes y propiedades experimentales del mayor número de moléculas.

Teniendo en cuenta las funciones empíricas de potencial que están implícitas en el Campo de Fuerzas que utiliza el programa Sybyl, la energía se puede expresar mediante la suma de varios términos independientes según la ecuación siguiente:

$$E = \sum E_{\text{str}} + \sum E_{\text{bend}} + \sum E_{\text{tors}} + \sum E_{\text{vdw}} + \sum E_{\text{oop}} + \sum E_{\text{ele}} \quad 5.1$$

donde:

- E_{str} : Energía de tensión de enlace.
- E_{bend} : Energía de flexión de enlaces.
- E_{tors} : Energía de torsión por giro alrededor de un enlace sencillo.
- E_{vdw} : Energía de van der Waals entre átomos no enlazados.
- E_{oop} : Energía de separación del plano en sistemas que presenten una estructura plana.
- E_{ele} : Energía de interacción electrostática entre átomos con una carga neta.

Energía de tensión de enlace

El término energía de tensión de enlace viene dado por el estiramiento y la compresión a la que están sometidos cada uno de los enlaces alrededor de su posición de equilibrio. Se define mediante la ecuación:

$$E_{\text{str}} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} k_{d_i} (d_i - d_i^0)^2 \quad 5.2$$

siendo:

N: número de enlaces.

d_i : longitud de i-ésimo enlace (Å).

d_i^0 : longitud de equilibrio del i-ésimo enlace (Å).

k_{d_i} : constante de fuerza ($\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$).

Energía de flexión

La energía de flexión corresponde a los cambios en los ángulos que forman los enlaces. Está expresada como:

$$E_{\text{bend}} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} k_{\theta_i} (\theta_i - \theta_i^0)^2 \quad 5.3$$

siendo:

N: número de ángulos.

θ_i : ángulo entre dos átomos adyacentes ($^\circ$).

θ_i^0 : valor de equilibrio para i-ésimo ángulo ($^\circ$).

$k_{\theta i}$: constante de fuerza ($\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot(^{\circ})^{-2}$).

Energía torsional

Las torsiones son creadas por una serie de tres enlaces y consisten en las rotaciones de los enlaces situados en los extremos con respecto al eje del enlace central. Está expresada como:

$$E_{\text{tor}} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} V_{\omega i} [1 + S_i \cos(n_i \omega_i)] \quad 5.4$$

siendo:

N: número de átomos.

$V_{\omega i}$: es la barrera de torsión ($\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).

S_i : toma el valor +1 para aquellas conformaciones que están alternadas y -1 cuando están eclipsadas.

n_i : periodicidad.

ω_i : ángulo de torsión.

Energía de van der Waals

Las interacciones de van der Waals son interacciones que se producen entre los átomos debido a su distribución de electrones y a la inducción de dipolos, lo que permite una débil atracción electrostática entre ellos, que se vuelve repulsiva a cortas distancias. Viene dada por la ecuación:

$$E_{\text{vdw}} = \sum_{i=1}^N \sum_{\substack{j>1 \\ \text{no unidos}}} E_{ij} \left[\frac{1.0}{a_{ij}^{12}} - \frac{2.0}{a_{ij}^6} \right] \quad 5.5$$

siendo:

N: número de átomos.

E_{ij} : constante de van der Waals ($\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).

r_{ij} : es la distancia entre los átomos i y j (\AA).

R_i o R_j : radio de van der Waals para el i -ésimo o j -ésimo átomo respectivamente (\AA).

a_{ij} : $r_{ij}/(R_i+R_j)$.

Energía de separación del plano

Es la energía que se pone en juego cuando un átomo, que inicialmente se encontraba formando parte de un grupo con una estructura plana (estable debido a la existencia de la resonancia electrónica), sale de ese plano rompiendo así la coplanaridad, tal y como ilustra la Figura 5.1.

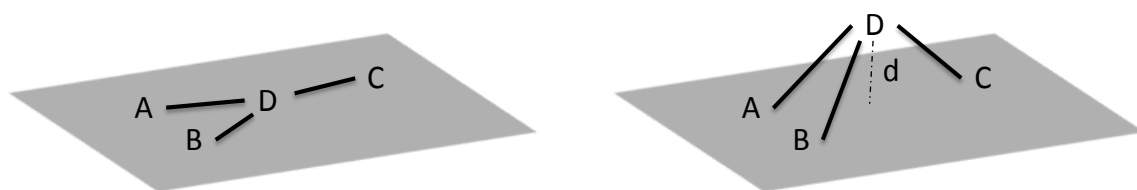


Figura 5.1. Esquema de una molécula donde todos sus átomos están en el plano (*izquierda*) y de una molécula cuyo átomo central se encuentra fuera del plano (*derecha*).

La energía de separación del plano viene dada por la ecuación:

$$E_{\text{oop}} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} k_{\text{oop}_i} d_i^2 \quad 5.6$$

siendo:

N : número de átomos.

d_i : distancia entre el átomo fuera del plano y dicho plano (\AA).

k_{oop_i} : constante de fuerza ($\text{Kcal} \cdot \text{\AA}^{-2}$).

Energía electrostática

Son las interacciones debidas a fuerzas electrostáticas de tipo culómbico entre átomos que poseen una carga neta.

$$E_{\text{ele}} = 332.17 \sum_{i=1}^{\text{Nátomos}} \sum_{\substack{j>1 \\ \text{no unidos}}} \frac{Q_i Q_j}{D_{ij} r_{ij}} \quad 5.7$$

donde:

D_{ij} : constante dieléctrica entre los átomos i y j .

Q_i y Q_j : carga neta atómica del i-ésimo y j-ésimo átomo respectivamente (e^-).

r_{ij} : distancia entre los átomos i y j (Å).

332.17: factor de conversión de unidades.

Parametrización

La característica más importante del campo de fuerzas es que su precisión a la hora de predecir la energía, las estructuras y las propiedades de las moléculas, depende de las funciones de potencial y de los parámetros elegidos.

La optimización de los parámetros se realiza normalmente con dos métodos límites:

1. Mínimos cuadrados.
2. Inspección.

En el método de inspección, la optimización de parámetros se realiza intentando reproducir el mayor número de datos estructurales, energías, frecuencias de vibración o algunas propiedades termodinámicas que puedan ser obtenidas de forma experimental. El problema radica en el número de condiciones, y por tanto, de variables simultáneas que hay que tener en cuenta en la optimización. De aquí que el método de mínimos cuadrados sea mucho más efectivo. Lifson y colaboradores^{9,10} han descrito un método de optimización lineal por mínimos cuadrados al que llaman *Campo de Fuerzas Consistente*. La principal ventaja de este método es la forma mecánica y más o menos precisa de optimización. Las desventajas radican en el tiempo de ordenador que se requiere para una buena optimización y que a la hora de evaluar errores, las unidades de los parámetros que se optimizan por ejemplo, longitudes y ángulos, no son las mismas. Para ello es necesario obtener un esquema de pesos estadísticos adecuados, que es revisado después de cada iteración, para evaluar el error cometido al manipular cada uno de los parámetros.

El proceso de optimización de los parámetros o parametrización no es necesario realizarlo cada vez que se quiera estudiar una molécula. Estos parámetros, cuya optimización se ha realizado en potentes ordenadores, se encuentran tabulados en una base de datos. El campo de fuerzas que usa el programa Sybyl (*Tripes Force Field*)⁶ tiene su propia base de datos, pero también permite el acceso a otras. El programa identifica la estructura y los átomos que intervienen y asigna automáticamente los parámetros optimizados definidos en su amplia base de datos.

Minimización de la energía

La energía es función de las coordenadas de los átomos en las moléculas, es decir, de su geometría. La minimización es un proceso iterativo de optimización de esa geometría con el fin de obtener una estructura con una energía menor y por tanto mucho más probable y estable que la de partida.

Uno de los problemas de la minimización es la incapacidad para encontrar un mínimo de energía global, es decir, una disposición de las coordenadas atómicas cuyo valor de energía sea el más bajo posible. La única forma de encontrar este mínimo global sería explorar de forma sistemática todas las diferentes coordenadas de partida. Otro problema importante es cómo encontrar ese mínimo para la función de energía, ya que depende de un gran número de variables: hay $3N$ variables (coordenadas cartesianas) que tenemos que optimizar. Muchos de los métodos usan técnicas de optimización considerando átomo por átomo, en otras en cambio, se optimizan la orientación de un conjunto de átomos como una unidad o también se pueden utilizar las coordenadas internas específicas, como por ejemplo ángulos de torsión, etc.

El algoritmo usado por Sybyl para la minimización de la energía se denomina MAXIMIN2³ y utiliza como método una combinación de la función de energía y de su primera derivada. Inicialmente, emplea el procedimiento denominado *SIMPLEX*¹¹ que consiste en evaluar la energía átomo por átomo modificando su posición hasta que la energía de cada uno de ellos se encuentre por debajo de un cierto valor. El método *SIMPLEX* no se basa en la derivada de la energía, por lo que se trata de un procedimiento rápido, aunque poco preciso. Los métodos de primera optimización usados en el MAXIMIN2 son cálculos mucho más refinados, ya que ajustan las coordenadas atómicas de todos los átomos de forma simultánea basándose en el método de la primera derivada de la ecuación de la energía. Existen cuatro procedimientos diferentes para obtener el mínimo local de dicha función:¹¹

1. *Máxima Pendiente*:¹² la dirección de la búsqueda es la derivada de la función de energía para el estado de la molécula en cada instante. No emplea información de iteraciones anteriores. El método converge bastante bien para sistemas altamente distorsionados donde la derivada tiene valores bastante grandes, aunque, en las zonas próximas al mínimo, las propiedades de convergencia son bastante pobres.

2. *Gradiente Conjugado*:¹¹ acumula información sobre la función de una iteración a la siguiente. Esta información se utiliza para acelerar el proceso de

minimización, especialmente, en las proximidades de los mínimos de la superficie de energía. Las propiedades de convergencia son superiores a las conseguidas con el método anterior. Este método es el que nosotros hemos utilizado en nuestras minimizaciones.

3. *Método de Powell*:¹³ es similar al método de *Gradiente Conjugado* pero utiliza reglas más avanzadas para determinar la dirección de descenso de la función de energía, el tiempo de cálculo es considerablemente mayor.

4. *Técnicas Newton-Raphson*:¹⁴ se trata de un método más sofisticado y que por tanto requiere un mayor tiempo de cálculo. Utiliza para la minimización la pendiente (primera derivada) y la curvatura de la superficie (segunda derivada).

5.3 Dinámica Molecular

La *Dinámica Molecular*^{1,2,15} (DM) consiste en simular mediante un ordenador el movimiento que, a lo largo de un cierto tiempo, realizan los átomos que componen una molécula, recogiendo la posición y velocidad instantánea de los mismos a intervalos regulares de tiempo. Mediante el análisis de cada una de las conformaciones resultantes de toda la dinámica es posible obtener información muy importante sobre el sistema. Así, por este procedimiento, se puede obtener la variación de una determinada propiedad con el tiempo o incluso si se utiliza el método de análisis adecuado, el estudio de propiedades en el equilibrio.

Para explicar el fundamento de la teoría, tomamos como ejemplo una molécula modelo aislada en el vacío, sin interaccionar con ninguna otra molécula y sin que sobre ella actúen ninguna fuerza externa. Pese a que no existan fuerzas exteriores, los átomos permanecerán en movimiento debido a dos efectos internos:

- *El campo de fuerzas interno de la molécula.* Los átomos interactúan entre sí mediante fuerzas de atracción y repulsión produciéndose elongaciones, contracciones, flexiones, rotaciones, etc. de los enlaces, que originarán fuerzas que pretenden devolver la molécula al estado de equilibrio.

- *La agitación térmica.* Es responsable de que cada átomo, i , tenga una energía cinética en todas las direcciones, que está determinada por la temperatura a la que se encuentre la molécula. Podemos simplificar esta contribución considerando que en DM nos interesa estudiar los movimientos relativos de unos átomos con respecto a otros y por lo tanto, a la energía cinética total le podemos restar las energías de rotación y traslación

de la molécula en su conjunto. Esto supone suprimir seis grados de libertad, siendo entonces la energía total:

$$E_T = E_C - E_{\text{Trans}} - E_{\text{Rot}} = \frac{L-6}{2} k_B T \quad 5.8$$

Una vez planteadas las bases en torno a cuáles son las fuerzas que actúan sobre nuestra molécula, nos interesa conocer en qué medida lo hacen y cómo influyen sobre cada uno de sus átomos en cada instante, observando la evolución de cada uno de ellos con el tiempo. Por lo tanto, empezaremos por adjudicar unas posiciones iniciales, \vec{r}_i , a nuestros átomos. Lo más razonable es que estas posiciones reproduzcan una conformación de mínimo relativo de energía. A partir de esta posición, se puede calcular la energía de la molécula, $E(\vec{r}_i)$, y con ella la fuerza que actúa sobre cada átomo, \vec{F}_i . A cada átomo le asignaremos una velocidad relacionada con la temperatura a la que se realiza el cálculo, \vec{v}_i . El movimiento de cada átomo, i , vendrá determinado por la ecuación de Newton:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = -\nabla E \quad 5.9$$

$$-\frac{\partial \vec{E}}{\partial \vec{r}_i} = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \quad 5.10$$

Esta ecuación habrá que aplicarla a cada átomo y en las tres direcciones del espacio, por lo que tendremos que resolver $3N$ ecuaciones diferenciales. La condición de contorno será $\vec{v}_i(t)$ y los límites de integración t y $t + \delta t$. De esta manera, podremos obtener $\vec{r}_i(t + \delta t)$, $E(t + \delta t)$, $\vec{F}_i(t + \delta t)$ y $\vec{v}_i(t + \delta t)$. Realizando el mismo proceso para distintos incrementos de tiempo podremos calcular la trayectoria de cada átomo a lo largo del tiempo. Sin embargo, a la hora de resolver estas integrales habrá que utilizar algún método para simplificarlas. Uno de los más intuitivos y utilizados es el algoritmo de Verlet.^{16,17} Este método consiste en una combinación de dos series de Taylor para la posición en los tiempos $t - \delta t$ y $t + \delta t$, conocida la posición a un tiempo t , mediante el desarrollo:

$$\vec{r}(t - \delta t) = \vec{r}(t) - \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\delta t^2 - \dots \quad 5.11$$

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\delta t^2 + \dots \quad 5.12$$

Sumando las dos series se puede eliminar la velocidad y despejar la posición del átomo a tiempo $t + \delta t$ conocidas sus posiciones a tiempos $t - \delta t$ y t así como su aceleración a tiempo t , que se calcula a partir de las fuerzas interatómicas mediante la segunda ley de Newton.

$$\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \vec{a}(t)\delta t^2 \quad 5.13$$

La velocidad se obtiene restando de la Ecuación 5.12 la 5.11:

$$\vec{r}(t + \delta t) - \vec{r}(t - \delta t) = 2\vec{v}(t)\delta t \quad 5.14$$

y de aquí se despeja obteniendo:

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t + \delta t) - \vec{r}(t - \delta t)}{2\delta t} \quad 5.15$$

En resumen, el algoritmo de Verlet se aplica siguiendo el siguiente esquema:

$$\text{Condiciones iniciales: } \left\{ \begin{array}{l} \vec{r}(t) \rightarrow \vec{F}(t) \rightarrow \vec{a}(t) \\ \vec{v}(t) \end{array} \right\} \rightarrow \vec{r}(t - \delta t)$$

Conocidas las posiciones iniciales de los átomos $\vec{r}(t)$ se calculan las fuerzas y a partir de éstas, las aceleraciones, que junto con las velocidades iniciales permiten obtener $\vec{r}(t - \delta t)$ mediante la Ecuación 5.11. Después se integran las ecuaciones de Newton y se realiza el siguiente paso. Por ejemplo, para un determinado paso j , en el que la posición viene dada por $\vec{r}(t + j\delta t)$, se calcula la fuerza $\vec{F}_i(t + j\delta t)$ y la aceleración $\vec{a}_i(t + j\delta t)$ y a partir de $\vec{r}(t + j\delta t)$ y $\vec{r}(t + (j-1)\delta t)$, se calcula la posición $\vec{r}(t + (j+1)\delta t)$ de acuerdo con la Ecuación 5.14.

Este algoritmo tiene como limitación el alto consumo de tiempo, ya que δt tiene que ser lo suficiente pequeño como para poder obtener buenas aproximaciones con las series de Taylor. Su peor inconveniente es que no existe control sobre las velocidades de las partículas, por lo que tampoco sobre las temperaturas del sistema. Las velocidades vienen controladas por las aceleraciones y éstas a su vez por las fuerzas, las cuales dependen de

las energías conformacionales, por este motivo, según la molécula se encuentre en un mínimo o en un máximo de energía, sus velocidades variarán mucho, y con ellas las temperaturas. Debido a ello, este método no es conveniente cuando se quiere trabajar a temperatura constante, que es por otro lado lo más habitual.

Uno de los algoritmos utilizado como alternativa al de Verlet que mejora la precisión y velocidad de cálculo, es el denominado *Salto de la Rana (Leap-frog)*¹⁸. Es el procedimiento más usado en cálculos de Dinámica Molecular. En este algoritmo cada uno de los intervalos δt se divide en dos y se supone que la aceleración permanece constante durante el tiempo $t-\delta t/2$ y $t+\delta t/2$. Las velocidades en los semi-intervalos $\vec{v}(t+\delta t/2)$ y las posiciones en los intervalos $\vec{r}(t+\delta t)$ se pueden calcular mediante las ecuaciones:

$$\vec{v}(t+\frac{\delta t}{2}) = \vec{v}(t-\frac{\delta t}{2}) + \vec{a}(t)\delta t \quad 5.16$$

$$\vec{r}(t+\delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t+\frac{\delta t}{2})\delta t \quad 5.17$$

De forma esquemática, el algoritmo se representa en la Figura 5.2 y se basa en:

- Tomar un $\vec{r}(t)$ inicial, preferiblemente una posición de equilibrio.
- Asignar unas velocidades aleatorias a cada átomo en función de la temperatura de cálculo para un tiempo $t-\delta/2$.
- A partir de $\vec{r}(t)$ se calcula $\vec{F}(t)$ y $\vec{a}(t)$.
- Con $\vec{a}(t)$ y $\vec{v}(t-\delta t/2)$ se calcula $\vec{v}(t+\delta t/2)$ mediante la Ecuación 5.16.
- Posteriormente con $\vec{v}(t+\delta t/2)$ y $\vec{r}(t)$ se obtiene $\vec{r}(t+\delta t)$ usando la Ecuación 5.17. A partir de aquí se puede iniciar de nuevo el ciclo.

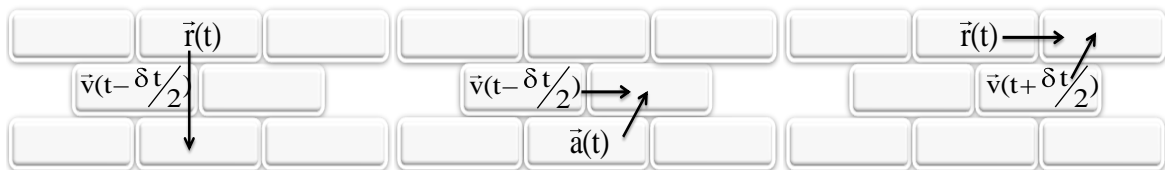


Figura 5.2. Esquema del algoritmo del *Salto de la Rana*.

Como puede observarse, las velocidades que se utilizan van siempre un semi-intervalo por detrás o por delante del resto de parámetros y sirven de apoyo para el cálculo de los siguientes intervalos, de ahí el nombre de *Salto de la Rana*. Por otro lado, al ser la velocidad una variable natural del algoritmo, el proceso nos permite ir controlando en todo momento la velocidad de los átomos y con ello su temperatura, que era el principal problema que presentaba el algoritmo de Verlet.

La única limitación de este método es la necesidad de emplear incrementos de tiempos δt muy pequeños, para conseguir una buena aproximación de la función de la aceleración con la función discreta. Esto no es un gran problema porque los tiempos de integración o incrementos son bastante menores que los movimientos moleculares más rápidos, como son los movimientos de vibración.

Metodología de las simulaciones de Dinámica Molecular

De forma general, cuando se realiza una Dinámica Molecular se suelen seguir los siguientes pasos:

a) *Construcción de la molécula* sobre la que se va a realizar el cálculo, para ello se le atribuyen longitudes de enlace, ángulos, cargas si se desea, etc. previamente conocidos. Normalmente todos los programas disponen de una base de datos en la que residen todos los parámetros medidos anteriormente en moléculas similares o si no los podemos asignar nosotros.

b) *Minimización de la energía de la molécula* con respecto a todas las coordenadas internas (longitudes, ángulos de enlace, ángulos de rotación, etc.) usando el algoritmo adecuado, con lo que obtendremos uno de los mínimos de energía en los que puede encontrarse la molécula.⁶

c) *Termostatación*. Es necesario asignar unas velocidades iniciales aleatorias \vec{v}_i para cada átomo de la molécula con la condición de que se reproduzca la temperatura de trabajo. No obstante, cuando se trabaja a temperaturas relativamente altas, estas velocidades van a ser muy grandes, por lo que si se asignan al azar se producen deformaciones drásticas en la molécula, poco realistas en los primeros momentos. A medida que transcurre el tiempo, el campo de fuerzas va actuando pudiéndose imponer sobre estas deformaciones y haciendo que la molécula vuelva a adoptar conformaciones más realistas. Todo este proceso puede resultar muy largo, además de generar resultados

incorrectos. Por todo ello, es mejor comenzar a bajas temperaturas (por ejemplo a 1 K) e ir aplicando incrementos de temperatura cada cierto tiempo hasta llegar a la temperatura deseada. Una vez alcanzada esta temperatura se deja que el sistema se equilibre (o *termostatice*) durante un tiempo y posteriormente se empiezan a recoger datos para su posterior análisis. Un factor que hay que tener en cuenta cuando se fija la temperatura de trabajo es, que si ésta no es lo suficiente alta puede llegarse a un punto durante la trayectoria en el que la molécula quede atrapada en un pozo de potencial, es decir, solo pueda moverse dentro de un intervalo restringido de energías, de manera que no se reproduzca su movimiento real.

d) *Adjudicación del intervalo de integración, δt* . El valor de tiempo δt para el que se hace cada ciclo de integración es un parámetro de gran importancia en todo el cálculo de DM. En un principio se puede pensar que cuanto menor sea éste más preciso será el cálculo, sin embargo esto conlleva mucho más tiempo, por ello es conveniente llegar a un compromiso entre ambos factores. Un valor mínimo será aquél que nos permita apreciar los movimientos más rápidos de la molécula que puedan influir en las propiedades que posteriormente se quieran obtener. Dicho valor mínimo será en nuestro caso, el determinado por los movimientos vibracionales de los enlaces cuyo tiempo de oscilación es del orden de las decenas del femtosegundo (10^{-15} s). Es por ello aconsejable que nuestro δt no supere las unidades de fs. El mínimo lo fijaremos en consecuencia con el número de acumulaciones y tanteando con distintos cálculos.

e) *Duración de la trayectoria de DM* es el tiempo durante el cual se estudia la molécula. Se define como el producto del número de ciclos de integración, excluyendo los utilizados en el proceso de termostatización, por el intervalo de integración δt . Aumentar el número de ciclos de integración implica aumentar la fiabilidad de los resultados, pero también, aumentar el tiempo de cálculo. Este tiempo ha de ser el suficiente para que la molécula pase por todas las conformaciones accesibles, sobre todo si lo que pretendemos es usar la DM para obtener propiedades de equilibrio. Conjuntamente con el apartado anterior, se realizarán un número determinado de pruebas y se elegirán los valores más adecuados.

f) *Obtención de datos*. Una vez que finaliza el periodo de termostatización se empiezan a recoger datos, lo que significa guardar una “imagen” o “fotograma” de la

conformación adoptada por la molécula cada cierto tiempo para su posterior análisis. En principio, se podría pensar en guardar las conformaciones obtenidas después de cada ciclo de integración, pero las variaciones de una conformación a la siguiente serían mínimas y los resultados serían ficheros con un número ingente de datos que harían que su análisis fuera muy largo y tedioso. Nuevamente se llega a un compromiso entre el detalle del análisis y la cantidad de datos que se pueden manejar y se suelen recoger datos cada cierto número de pasos de integración, por ejemplo, tomando un “fotograma” cada 250 fs si $\delta t = 1$ fs.

g) *Análisis de los resultados.* Consiste en obtener cómo varían las magnitudes conformacionales interesantes para nuestro estudio “de fotograma a fotograma”, es decir, a lo largo del tiempo, o bien calcular valores en equilibrio dando el mismo peso a cada una de las conformaciones.

5.4 Simulaciones con disolvente

La mayoría de los procesos químicos importantes tienen lugar en disolución y por tanto, no se conseguirán unos cálculos realistas si consideramos las moléculas como sistemas aislados en el vacío. Para aumentar la precisión y la fiabilidad de las simulaciones, debemos considerar e incluir en los cálculos las interacciones que presentan las moléculas del sistema de estudio con las del disolvente.¹⁹ Desafortunadamente, cuanto más preciso y realista sea la simulación con el disolvente, más serán las horas de cálculo que se necesitan para abordar el mismo problema.

Entre los diferentes algoritmos para simular procesos en disolución, nosotros hemos utilizado en nuestros cálculos el denominado como *Molecular Silverware*.

5.4.1 Molecular Silverware

Es un algoritmo para empaquetar moléculas de forma rápida. Se puede emplear para solvatar una molécula de soluto con un número cualquiera de moléculas de disolvente o para encontrar el mejor ajuste entre dos moléculas. *Molecular Silverware*²⁰ construye una caja periódica donde va a ir añadiendo una por una las moléculas de disolvente a cada uno de los solutos. Cada molécula de disolvente se añade de tal forma que su superficie de van der Waals no se superponga con la superficie de van der Waals de ninguna otra molécula que esté presente previamente. De forma sucesiva, solo se va a añadir una molécula cada vez, por lo que el empaquetamiento del disolvente alrededor del

soluto va a ser muy bueno, aunque mucho más lento que en otros métodos en los que se colocan las moléculas de soluto en una caja, donde previamente ya están presentes todas las moléculas de disolvente. Además, este procedimiento presenta muchas ventajas: se puede emplear con cualquier disolvente; las energías resultantes del sistema son lo suficientemente bajas como para que se pueda realizar una dinámica después de una pequeña minimización; las moléculas de disolvente van a rellenar cualquier cavidad presente en el soluto; etc.

5.4.2 Condiciones Periódicas de Contorno (PBC)

Para evitar efectos no deseados en los límites de la caja de disolvente se suelen aplicar a los cálculos *Condiciones Periódicas de Contorno* (más conocidos por sus siglas en inglés *Periodic Boundary Conditions*, PBC).^{3,19} Esta técnica consiste en rodear por todos los lados la molécula de estudio con réplicas exactas del sistema que forma el disolvente, creando un entorno infinito. En la Figura 5.3 se muestra un esquema en 2 dimensiones, donde la molécula (x) se sitúa en la parte central y copias de las moléculas de disolvente que rodean al sistema se disponen alrededor. Cualquier molécula que sale de un lado aparece en el otro, consiguiendo así que se mantenga constante el número de moléculas de disolvente en el sistema de estudio.

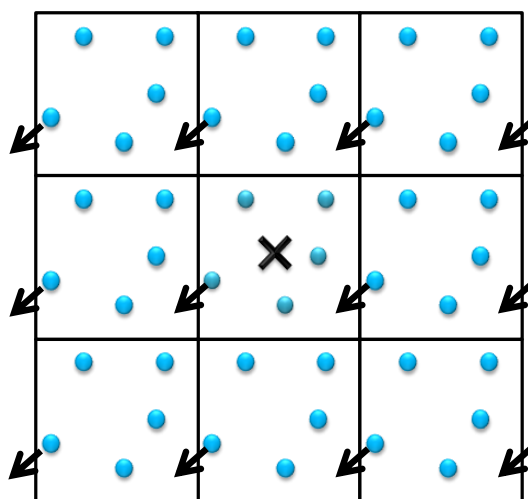


Figura 5.3. Esquema en dos dimensiones que ilustra las *Condiciones Periódicas de Contorno*. La x representa la molécula de estudio y las bolitas azules, las moléculas de disolvente.

5.5 Metodología utilizada en la simulación de los diferentes procesos

5.5.1 Inclusión de una molécula huésped en ciclodextrinas hidroxipropiladas (Capítulo 7)

En las simulaciones de los procesos de inclusión de una molécula huésped en el interior de la CDs, descritos en el Capítulo 7^{21,22} (del 2,3- naftoato de dimetilo y el 1-naftoato de metilo con las 2-hidroxipropil α -, β - y γ -ciclodextrinas, HPCDs), se utilizó la Mecánica Molecular y una metodología muy similar a la utilizada anteriormente en otros estudios de complejación con ciclodextrinas.²³⁻²⁶ La distancia *cut-off* o distancia máxima a la que se tienen en cuenta las interacciones no enlazantes, fue de 8 Å y como método de optimización y terminación se utilizaron los algoritmos de Simplex y gradiente conjugado (con gradientes de 0.2 y 1.0 kcal·mol⁻¹Å⁻¹ en el vacío y en agua, respectivamente). Los cálculos en presencia de moléculas de disolvente se realizaron utilizando el algoritmo de Silverware²⁰ y se aplicaron condiciones periódicas de contorno (PBC). La permitividad eléctrica se fijó a $\epsilon=3.5$ ($\epsilon=1$) para las simulaciones en vacío (agua). Las cargas de las ciclodextrinas fueron obtenidas por MOPAC.²⁷ La energía de interacción se obtuvo como la diferencia entre la energía de potencial del sistema entero y la suma de las energías de potencial de cada uno de sus componentes de forma individual.

Para la simulación se situó cada ciclodextrina hidroxipropilada (HPCD) en un sistema de coordenadas, como se muestra en la Figuras 5.4 y 5.5. Así, el centro de masas de los oxígenos glicosídicos (*o*) se localizó en el origen del sistema, el eje *y* se orientó a lo largo del eje principal de la HPCD y el *z* de manera que contuviese uno de los oxígenos glicosídicos.

Para definir la orientación relativa entre el macrociclo (molécula anfitrión) y el cromóforo (molécula huésped) se emplearon tres parámetros:

- d*: la proyección de *oo'* sobre la coordenada *y* (*o'* corresponde al centro de masas del derivado de naftaleno).
- δ : el ángulo definido por las posiciones *oo'*C9 (C9 pertenece al grupo naftaleno).
- θ : el ángulo diedro entre los planos *yz* y el plano que contiene al derivado de naftaleno.

Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta dos aproximaciones en el caso de los complejos con 23DMN/HPCD (*polar*, P y *no polar*, NP), tal y como indica la Figura 5.4

y cuatro en el caso de 1MN/HPCD, como se muestran en la Figura 5.5 (*polar*, P y *no polar*, NP, para cada orientación vertical, V y horizontal, H). Para obtener la orientación más favorable durante la aproximación de la molécula huésped a la ciclodextrina, se realizaron cálculos de energía en el vacío de cada una de las estructuras optimizadas obtenidas al variar los ángulos δ y θ y la distancia, d , para todas las aproximaciones posibles y los tres tipos de ciclodextrinas (α -, β - y γ HPCD). Posteriormente, se analizaron de manera crítica los resultados y se determinaron los ángulos δ y θ óptimos de menor energía de interacción para cada una de esas aproximaciones. Estos ángulos óptimos fueron entonces fijados y se fue variando la distancia d a lo largo de la coordenada y desde +20Å hasta -20Å a intervalos de 0.5Å. Cada estructura generada durante este proceso de aproximación fue solvatada (empleado agua como disolvente), optimizada y posteriormente analizada. Para cada una de ellas se obtuvieron diferentes parámetros energéticos y geométricos, como la energía de interacción, sus contribuciones, la distancia, d , los ángulos δ y θ etc.

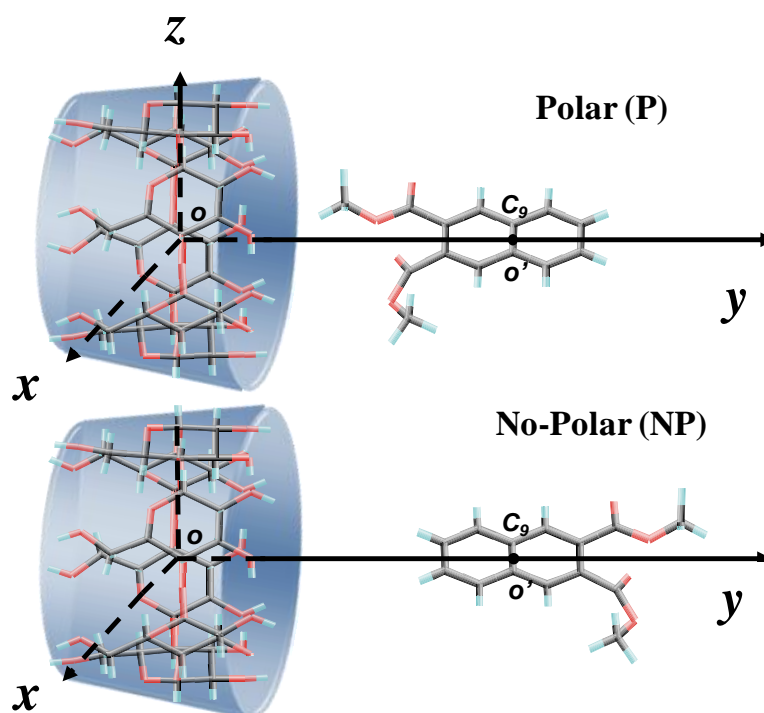


Figura 5.4. Sistema de coordenadas usado en los cálculos de Mecánica Molecular, mostrando las dos posibles aproximaciones del cromóforo 23DMN a la HPCD: Polar (*superior*) y No Polar (*inferior*).

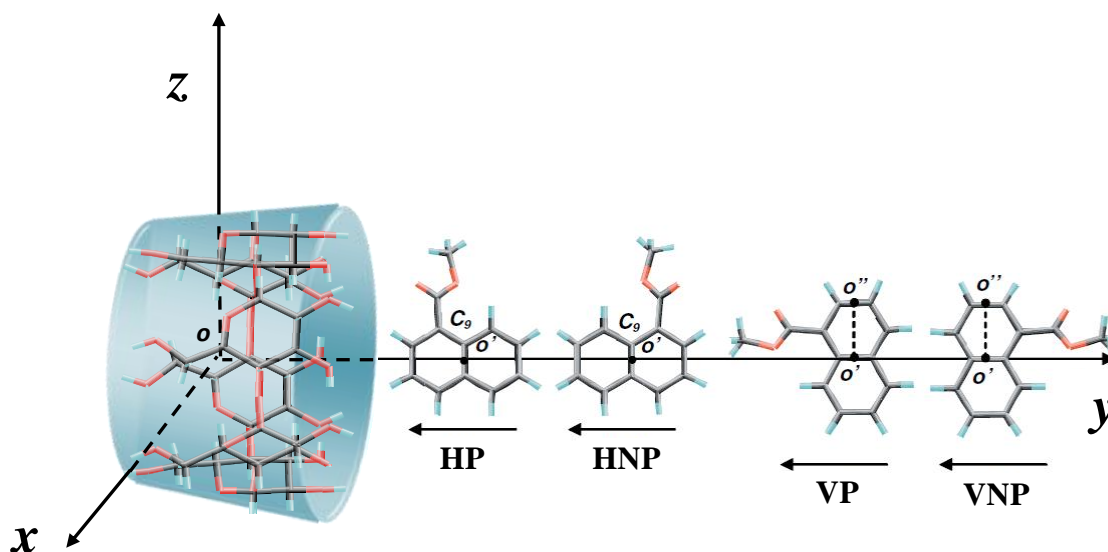


Figura 5.5. Sistema de coordenadas usado en los cálculos de Mecánica Molecular, mostrando las cuatro posibles aproximaciones del cromóforo 1MN a la HPCD: Horizontal Polar (HP) y No Polar (HNP) y Vertical Polar (P) y No Polar (VNP).

5.5.2 Estructura y procesos de dimerización de ciclodextrinas modificadas (*Xm*- y *Nm*CDs) (Capítulos 8 y 9)

Para el estudio de estos procesos se utilizaron cálculos de MM y DM, también realizados con el programa Sybyl y el campo de fuerzas Tripos. La permitividad eléctrica fue fijada a $\epsilon=3.5$ y $\epsilon=1$ para las simulaciones en vacío y en agua, respectivamente. Las cargas de las ciclodextrinas fueron obtenidas por MOPAC.²⁷ Las optimizaciones se llevaron a cabo mediante el algoritmo Simplex y el de gradiente conjugado como método de terminación con gradiente de 0.2 (3.0) $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{\AA}^{-1}$ para los cálculos realizados en vacío (agua). La distancia cut-off también se fijó a 8\AA . Para los cálculos en agua, se emplearon el algoritmo Silverware²⁰ y las condiciones periódicas de contorno.

Estudio conformacional del monómero

La conformación de cada ciclodextrina viene definida por:

1. Los ángulos de torsión (Figura 5.6):

ϕ : formados por los átomos C(4)-C(1)-O-C(4').

ψ : formados por los átomos C(1)-O-C(4')-C(1').

χ : formados por los átomos C(4)-C(5)-C(6)-O.

Los ángulos de torsión toman valores positivos si cuando miramos desde el primer átomo hacia el segundo, el ángulo que forman tiene el sentido de las agujas del reloj.

2. El ángulo de flexión τ definido por el oxígeno puente C(1)-O-C(4').

Además, en el caso de las ciclodextrinas de estudio modificadas con un grupo cromóforo bidentado en las posiciones C(2) y C(3), también es importante definir los ángulos de torsión que forman parte de la “bisagra” que unen el cromóforo a la ciclodextrina.

3. Estos ángulos de torsión los definimos como **X**, son cuatro y están formados por los átomos :

X1: C(1)-C(2)-O-CH₂.

X2: C(2)-O-CH₂-C^{ar}.

X3: C(4)-C(3)-O-CH₂.

X4: C(3)-O-CH₂-C^{ar}.

Dichos ángulos son comunes a *XmCD* y *NmCD*, ya que la secuencia de átomos que unen el cromóforo a la ciclodextrina es la misma en ambos casos.

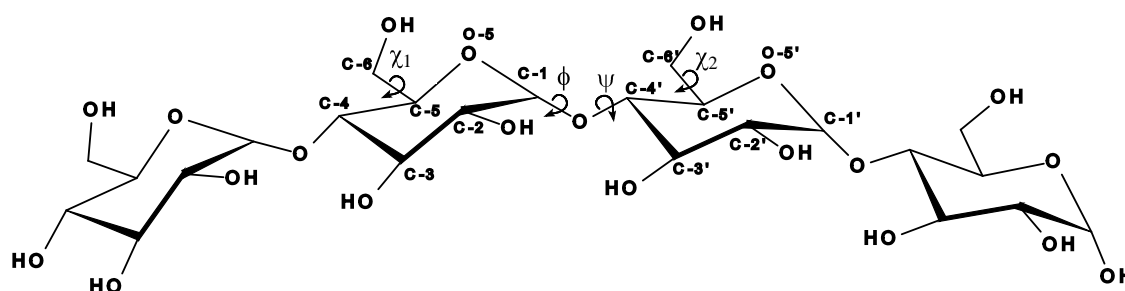


Figura 5.6. Esquema del fragmento de una ciclodextrina indicando los ángulos y la numeración de los átomos utilizada.

Para establecer cuáles eran los ángulos de torsión **X** óptimos, se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular de 10 ns en el vacío sobre un trímero de unidades de glucopiranosas lineales, cuya unidad central contiene el sustituyente unido de forma bidentada a las posiciones C(2) y C(3) de una misma unidad de glucopiranosas. El total de

estructuras generadas corresponde realmente a 400 conformaciones diferentes, que después de minimizarse en el vacío (gradiente $0.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{\AA}^{-1}$), se analizaron y seleccionaron aquellas 20 de menor energía y se utilizaron como conformaciones de partida para los cálculos posteriores.

Para estudiar el comportamiento conformacional del monómero aislado, se realizaron trayectorias de Dinámica Molecular a diferentes temperaturas, preferentemente en el vacío (y algunas en agua). Todos los parámetros conformacionales se dejaron variar durante la trayectoria, excepto los enlaces donde están implicados los átomos de H que fueron fijados, es decir que no se dejaron vibrar durante el cálculo. Estas vibraciones son muy rápidas y apenas influyen en los resultados y se consigue ahorrar bastante tiempo de cálculo, sobre todo en presencia de agua como disolvente.

Para el caso de las XmCDs, las trayectorias de DM fueron de 1 ns en el vacío (3 ns en agua), se realizaron empezando desde 1 K de temperatura y se fue incrementando en intervalos de 20 K, dejando que el sistema se equilibrase en cada paso durante 400 fs (500 fs), hasta alcanzar la temperatura de interés. Una vez alcanzada esta temperatura se dejó un periodo de equilibrado adicional de 100000 fs (25000 fs) en el vacío (agua). Este tiempo de calentamiento y equilibrado se descartó en el análisis. Para la trayectoria se empleó 1 fs (2 fs) de tiempo de integración y las velocidades del sistema fueron reescaladas cada 100 fs. Se grabaron las estructuras cada 200 fs (250 fs) para las trayectorias en el vacío (agua) para su posterior análisis. Las simulaciones de DM, preferentemente en el vacío, fueron realizadas a varias temperaturas desde 300 K hasta 550 K (400 K) a intervalos de 50 K. Con estas simulaciones a altas temperaturas lo que conseguimos es barrer un amplio espacio conformacional, evitando que la molécula se quede atrapada en un pozo de potencial durante las trayectorias. Como indicamos, también se realizaron algunos cálculos en agua que dieron resultados similares a costa de más tiempo de cálculo.

En el caso de las NmCDs, se siguió un protocolo similar aunque se realizaron DM en el vacío con una trayectoria de 5ns y las simulaciones de temperatura fueron realizadas de 350 a 600 K.

Estudio de la dimerización de las CDs modificadas

El procedimiento es parecido al utilizado para la inclusión de una molécula huésped en la CD. Para la conformación de partida de cada CD se empleó una estructura

monomérica optimizada no distorsionada. Una de ellas se orientó de manera que el centro de masas de los oxígenos glicosídicos (llamado como o) coincidiese con el origen de un sistema de coordenadas cartesiano. El eje z pasa a través del oxígeno glicosídico unido al C4 en la unidad de glucopiranososa que está sustituida por un grupo cromóforo y el eje y coincidiendo con el eje principal de la CD. La segunda molécula de CD se sitúa paralela al plano xz y en el eje y a una distancia donde ambas CDs no interaccionan, tal y como se muestra en la Figura 5.7. La orientación relativa de las dos ciclodextrinas viene definida por:

- d : la distancia entre las dos ciclodextrinas o proyección de oo' en la coordenada y .
- θ : el ángulo diedro entre los planos $O(4)oo'$ y $oo'O(4')$.
- ε : el ángulo $oo'O(4')$.

La segunda ciclodextrina puede aproximarse con tres orientaciones diferentes llamadas: cabeza-cabeza (HH, de sus siglas en inglés *Head-Head*), cabeza-cola (HT, del inglés *Head-Tail*) y cola-cola (TT, del inglés *Tail-Tail*), también indicadas en la Figura 5.7.

En ambos casos, $XmCDs$ y $NmCDs$, para obtener la orientación más favorable se fue variando el ángulo diedro θ desde -180° a $+180^\circ$ de 10° en 10° , el ángulo ε desde 50° a 130° de 10° en 10° y la distancia d de 20 \AA a 6 \AA a intervalos de 1 \AA . A continuación, cada conformación obtenida en el vacío se optimizó con un gradiente de $0.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{\AA}^{-1}$.

Después de este procedimiento se obtuvieron los valores de θ y ε con energía de interacción entre CDs más favorable. Fijado los ángulos θ y ε se fue variando la distancia entre los centros de las ciclodextrinas desde 20 a 6 \AA a intervalos de 0.5 \AA . Cada estructura generada se solvató (empleando agua como disolvente y aplicando Molecular Silverware y PBC) y se optimizó usando un gradiente de $1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{\AA}^{-1}$. Las conformaciones de mínima energía obtenidas fueron optimizadas de nuevo con un gradiente de $0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{\AA}^{-1}$ y fueron usadas como conformaciones de partida para realizar simulaciones de DM de 1.0 ns en presencia de agua a la temperatura de 300K , siguiendo el mismo procedimiento (termostatización, etc.) que en el caso del estudio del monómero, descrito anteriormente.

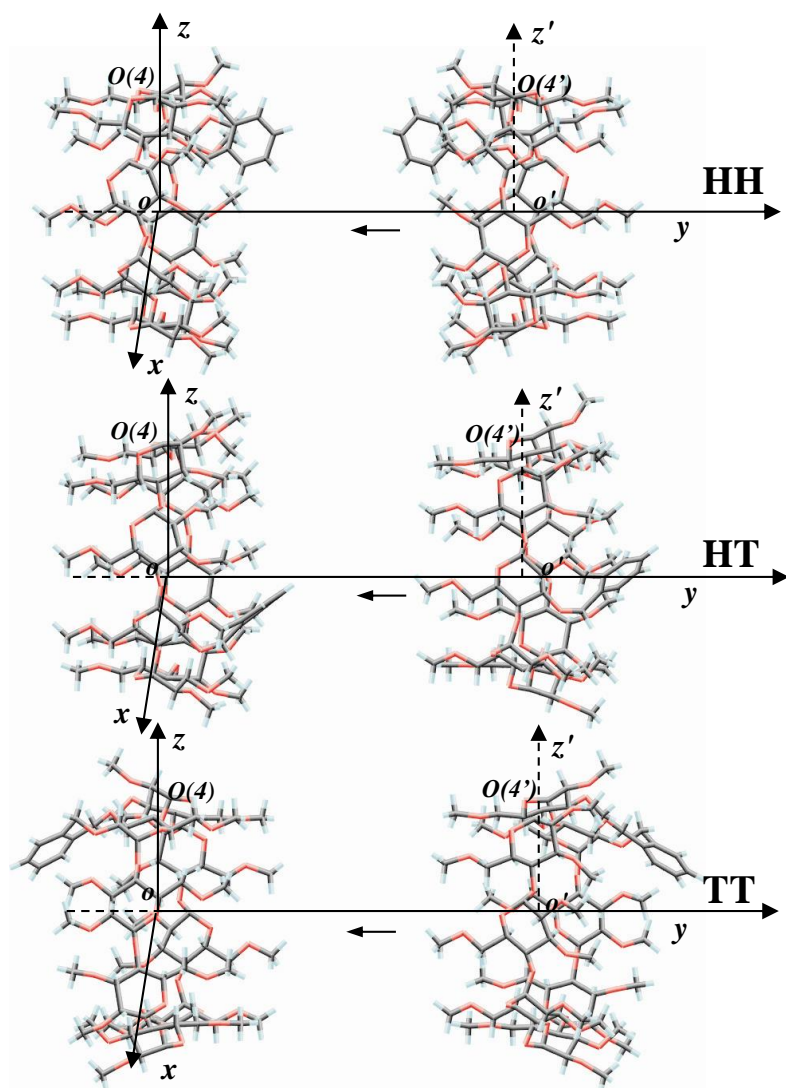


Figura 5.7. Sistemas de coordenadas empleados para simular el proceso de dimerización usando las diferentes aproximaciones: cabeza-cabeza (HH), cabeza-cola (HT) y cola-cola (TT) para $Xm\gamma$ CDs. Las diferentes aproximaciones son análogas para el resto de las Xm CDs y las Nm CDs

De forma similar, en algunos casos estudiamos la posible formación de trímeros a partir de los monómeros de $Xm\gamma$ CD o $Nm\gamma$ CD. Partiendo de la estructura más favorable de máxima energía de interacción del dímero HT se añadió otra ciclodextrina y se aplicó un protocolo similar al del estudio del dímero. Posteriormente la estructura de mínima energía obtenida fue optimizada ($0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{\AA}^{-1}$) y se realizaron simulaciones de DM (1 ns y 1.5 ns para $Xm\gamma$ CD y $Nm\gamma$ CD, respectivamente) a la temperatura de 300K.

5.5.3 Inclusión de una molécula huésped en ciclodextrinas modificadas (*Xm*CDs y *m*CDs) (Capítulo 10)

La metodología y procedimientos son muy similares a los descritos en la sección 5.4.1, para procesos de complejación de una molécula huésped con las HPCDs. Las cargas para las moléculas *Xm*CDs, *m*CDs y la sonda fluorescente, 2-metilnaftoato (2MN) fueron obtenidas mediante el programa MOPAC (AM1) tal y como lo hemos usado en otros trabajos anteriores.²⁸⁻³⁴ Para la optimización de la energía se empleó también el método Simplex y el de gradiente conjugado como método de minimización y terminación, con gradientes de 0.2 y 3.0 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹ para el vacío y agua, respectivamente. El sistema fue solvatado mediante el mismo algoritmo utilizado anteriormente (Silverware) y se emplearon condiciones periódicas de contorno (PBC).

La estrategia seguida para la obtención de las estructuras más favorables es similar a la descrita anteriormente.^{21,22,25,31,35} Se utilizaron CDs no distorsionadas como molécula anfitrión de partida, situando el centro de masas de los oxígenos glicosídicos que forman la ciclodextrina en el centro de coordenadas del sistema, de forma análoga a la Figura 5.4. Al igual que en el caso del Capítulo 7, los parámetros que definen la conformación del sistema son la distancia *d* y los ángulos δ y θ . Se tuvieron en cuenta las orientaciones *polar* (P) y *no polar* (NP) (Figura 5.4) como formas de aproximación del 2MN a las diferentes CDs. Se obtuvieron las conformaciones más favorables en el vacío, mediante el análisis de las energías de interacción entre las diferentes CDs y el 2MN, al variar los ángulos δ (y θ) en el intervalo 10-100° (0-55°) a intervalos de 10° (5°) y la distancia *d* desde + 10 Å a - 6 Å a intervalo de 2 Å. Fijados los ángulos δ y θ más favorables, se generaron las diferentes estructuras resultantes de variar la distancia 2MN-CD sobre la coordenada y entre 20 Å a -20 Å a intervalos de 0.5 Å. Cada una de estas estructuras fue solvatada, optimizada y guardada para un posterior análisis. Las estructuras 2MN/CD energéticamente más favorables fueron optimizadas de nuevo con un gradiente 0.5 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹ y se emplearon como conformaciones de partida para un cálculo de DM de 1ns a la temperatura de 300K.

El protocolo de DM empleado es similar al utilizado en apartados anteriores^{33,34} (un periodo de equilibrado de 25000 fs, paso de integración de 2fs, las velocidades fueron reescaladas cada intervalos de 100 fs, los datos se guardaron cada 250 fs, etc.).

5.6 Referencias

- (1) Gelin, B. R. *Molecular Modeling of Polymer Structures and Properties*; Hanser Publishers, 1994.
- (2) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Prentice Hall; 2 edition 2001.
- (3) Tripos Assoc. SYBYL Theory Manual. St. Louis, USA Version 6.3. 1996.
- (4) Burkert, U.; Allinger, N. L.; Editors *ACS Monograph, No. 177: Molecular Mechanics*; ACS, 1982.
- (5) Foresman, J. B.; Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, Second Edition ed.; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1996.
- (6) Clark, M.; Cramer, R. D., III; Van, O. N. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982.
- (7) White, D. N. *J. Comput. Chem.* **1977**, *1*, 225.
- (8) Vinter, J. G.; Davis, A.; Saunders, M. R. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1987**, *1*, 31.
- (9) Warshel, A.; Lifson, S. J. *J. Chem. Phys.* **1970**, *53*, 584.
- (10) Niketić, S. R.; Rasmussen, K. *The Consistent Force Field*; Springer: Nueva York, 1977.
- (11) Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolski, S. A.; Vetterling, W. T. E. *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing* Cambridge University Press 1988.
- (12) Wiberg, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1070.
- (13) Powell, M. J. D. *Mathematical Programming* **1977**, *12*, 241.
- (14) Hilderbrandt, R. L. *Comput. Chem.* **1977**, *1*, 179.
- (15) Haile, J. M. *Molecular Dynamics Simulations: Elementary Methods*; John Wiley and Sons: Nueva York, 1992.
- (16) Verlet, L. *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98.
- (17) Verlet, L. *Phys. Rev.* **1968**, *165*, 201.
- (18) Allen, M. P.; Tildsley, D. J. *Computer Simulations of Liquids*; Claredon Press: Oxford, 1987.
- (19) Milne, G. W. A.; Nicklaus, M. C.; Hodoscek, M. *J. Mol. Struct.* **1993**, *291*, 89.
- (20) Blanco, M. *J. Comput. Chem.* **1991**, *12*, 237.
- (21) Usero, R.; Alvariza, C.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 1103.

- (22) González-Álvarez, M. J.; Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 449.
- (23) Cervero, M.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1572.
- (24) Pastor, I.; Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Photochem. Photobiol., A* **2005**, *173*, 238.
- (25) Alvariza, C.; Usero, R.; Mendicuti, F. *Spectrochim. Acta, Part A* **2007**, *67*, 420.
- (26) Di Marino, A.; Rubio, L.; Mendicuti, F. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *58*, 103.
- (27) Frisch, M. J.; et. al. MOPAC (AM1), included in the Gaussian 03 package.; Gaussian 03, Revision C.02, ed.; Gaussian, Inc: Wallingford CT, 2004.
- (28) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1579.
- (29) Madrid, J. M.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2037.
- (30) Madrid, J. M.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1621.
- (31) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *58*, 295.
- (32) Madrid, J. M.; Pozuelo, J.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *193*, 112.
- (33) González-Álvarez, M. J.; Balbuena, P.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717.
- (34) González-Álvarez, M. J.; Vicente, J.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975.
- (35) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **2004**, *58*, 823.

Parte Experimental

6.1 Descripción de los instrumentos

6.1.1 Instrumentación de Fluorescencia

En la mayoría de las medidas realizadas por fluorescencia, tanto de estado estacionario, como de resolución temporal, se utilizaron cubetas de cuarzo cilíndricas de 2 mm de paso óptico y 150 µL de capacidad. En ocasiones puntuales, se emplearon cubetas de cuarzo de sección cuadrada de 1 cm de paso óptico y 3 mL de capacidad.

Es importante señalar que dependiendo del sistema y sobre todo a las concentraciones más altas (que más absorben), hubo que realizar correcciones debidas al *efecto interno*.¹ Para corregirlo se empleó la expresión 6.1:

$$I_{corr} = I_{obs} \operatorname{antilog} \left(\frac{A_{ex} + A_{em}}{2} \right) \quad 6.1$$

donde A_{ex} y A_{em} son los valores de la absorbancia a la longitud de onda de excitación y emisión respectivamente.

Todas las muestras fueron medidas en sus correspondientes portacubetas termostatzadas mediante baños de recirculación (Huber Ministat).

6.1.1.1 Espectrofluorímetro de Estado Estacionario

El instrumento empleado para todas las medidas de fluorescencia en estado estacionario fue un espectrofluorímetro SLM 8100 AMINCO (Figuras 6.1 y 6.2). Consta de una lámpara de arco de Xenón de 450 W como fuente de excitación, dos monocromadores de tipo rejilla holográfica en el paso de excitación y uno simple en la de emisión, y como detector un fotomultiplicador Hamamatsu (R928, UV/VIS-Red) sensible al rojo y refrigerado mediante un sistema Peltier, para incrementar sensiblemente la relación señal/ruido. Los polarizadores tipo Glan-Thompson se situaron para todas las medidas (excepto anisotropía) en condiciones de *ángulo mágico* (polarizador de excitación en posición vertical y polarizador de emisión orientado 54.7° con respecto a la vertical).

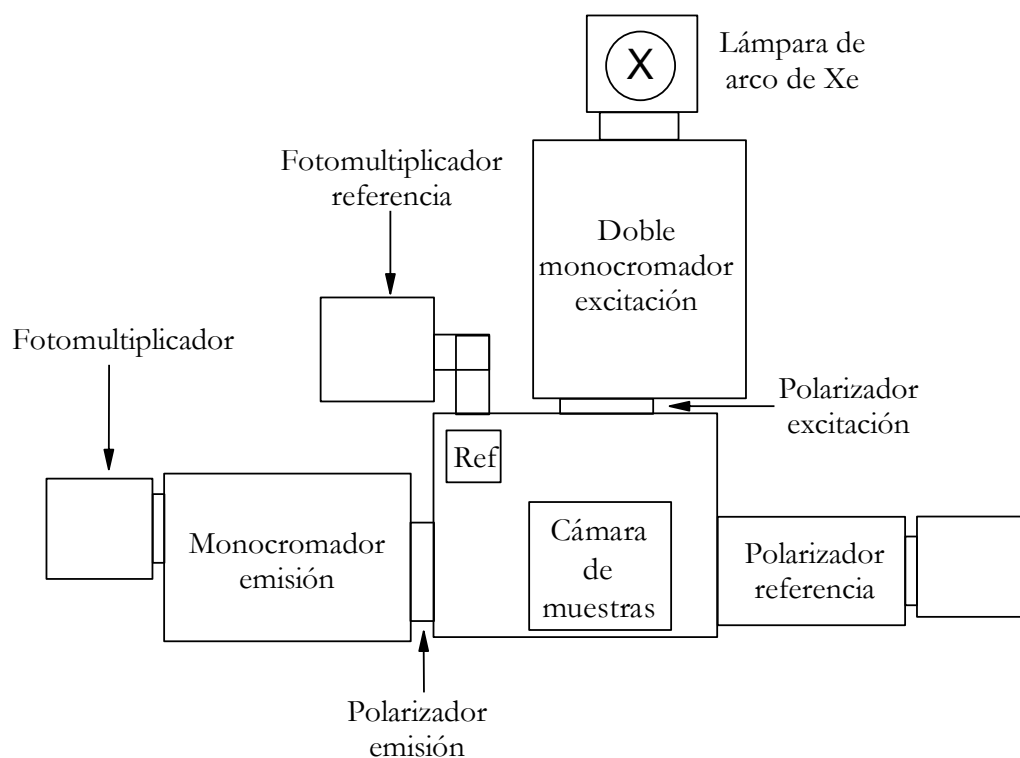


Figura 6.1. Representación esquemática de espectrofluorímetro SLM 8100 AMINCO.

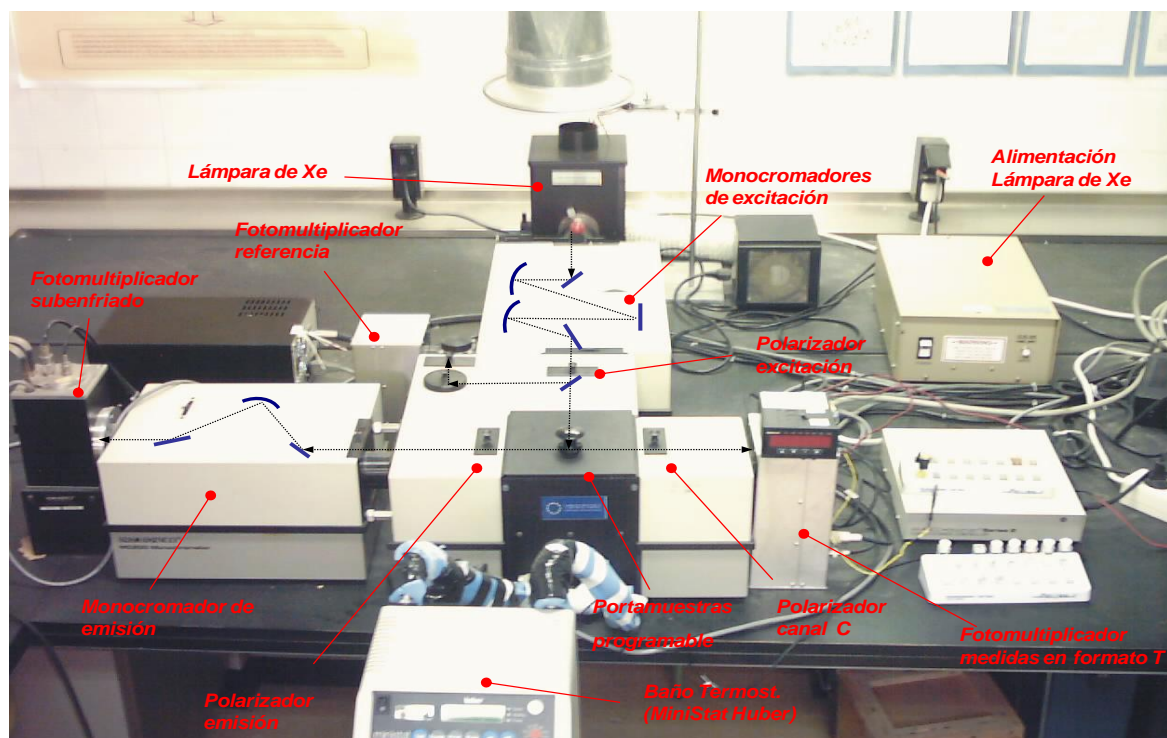


Figura 6.2. Imagen y esquema de los diferentes elementos que configuran el espectrofluorímetro SLM 8100 AMINCO.

La lámpara de Xe emite luz de una forma continua que pasa a través del monocromador de excitación y selecciona una banda estrecha de longitudes de onda como haz incidente. Los polarizadores se encargan de girar el plano de polarización de la luz a un ángulo determinado. Esta radiación atraviesa la muestra y la intensidad emitida se detecta a 90° a una longitud de onda concreta, que es seleccionada mediante el monocromador de emisión. Finalmente, la fluorescencia es detectada en el tubo fotomultiplicador, analizada y cuantificada mediante los adecuados dispositivos electrónicos.²

6.1.1.2 Espectrofluorímetro de Resolución Temporal

Las medidas de tiempo de vida de fluorescencia se han realizado en un espectrofluorímetro de conteo de fotones individuales correlacionados temporalmente (conocido por sus siglas en inglés *Time-Correlated Single-Photon Counting*, TCSPC) FL900 Edinburgh Instruments (Figuras 6.3 y 6.4). El aparato dispone de un doble monocromador en los pasos de excitación y emisión. Las medidas se tomaron en ausencia de polarizadores. La fuente de luz del aparato es una lámpara de pulsos (nF900) que consiste en una cavidad llena de gas (en todos los experimentos se empleó H₂ a baja presión (0.4 atm)) donde se generan descargas de alto voltaje controladas por una célula tiratrón. El ancho de banda en los monocromadores de excitación y emisión se situó a 18 nm. El sistema de detección consiste en un fotomultiplicador Hamamatsu R955 subenfriado mediante un sistema tipo Peltier.

De forma puntual, cuando se necesitó una mayor intensidad de emisión, se utilizaron *NanoLeds* monocromáticos. Los NanoLeds son fuentes de radiación que usan una combinación de Leds (de su siglas inglesas *LED: Light-Emitting Diode*: ‘diodo emisor de luz’) y LD (*LD: Laser Diode*) para generar pulsos ópticos del orden del nanosegundo y picosegundo, pudiendo emitir desde la zona del UV lejano hasta el IR cercano. Estos dispositivos consumen muy poca energía, son fáciles de manipular y no requieren ningún tipo de mantenimiento. Aunque, a diferencia de la lámpara de pulsos, cada dispositivo solo emite luz de una longitud de onda determinada, la intensidad de emisión del NanoLed es mucho mayor, lo que resulta especialmente útil cuando las muestras presentan una baja fluorescencia.

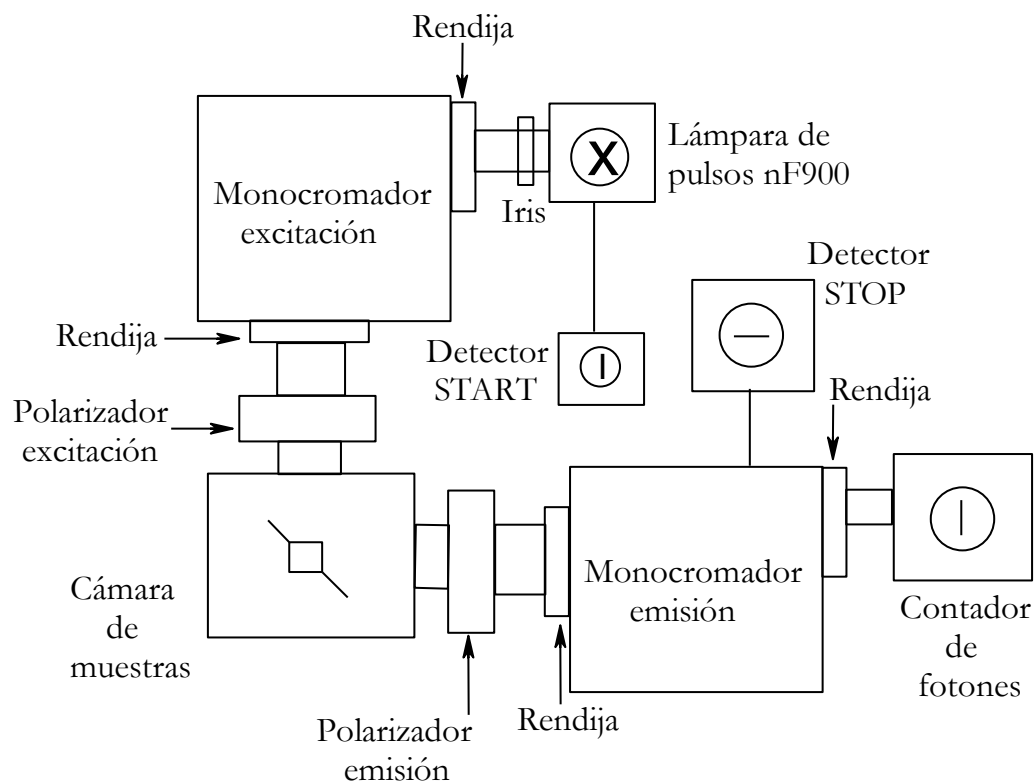


Figura 6.3. Dibujo esquemático del espectrofluorímetro TCSPC.

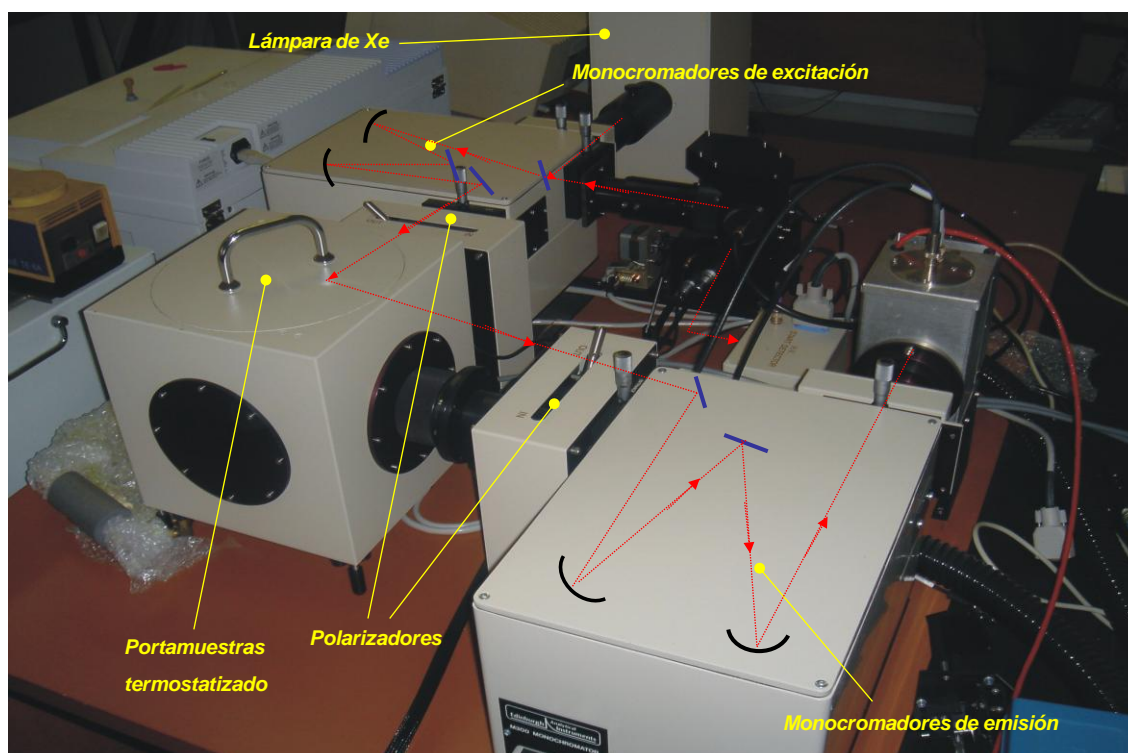


Figura 6.4. Imagen y esquema de elementos de espectrofluorímetro TCSPC.

El funcionamiento y proceso de análisis de datos de un TCSPC es algo más complejo que el de un espectrofluorímetro de estado estacionario. La base experimental consiste en la medida del intervalo de tiempo entre el pulso de la lámpara y la llegada de ese pulso al ánodo del fotomultiplicador, ajustándose la intensidad para que el pulso sea debido a la incidencia de un fotón sobre el fotocátodo. Dicho intervalo de tiempo se mide utilizando un convertidor de tiempo en amplitud de voltaje (*Time-to-Amplitude Converter*, TAC). El pulso de la lámpara inicia el TAC que genera un voltaje, el cual se incrementa linealmente con el tiempo; cuando un fotón, procedente de la muestra, es detectado en el fotomultiplicador el pulso del ánodo detiene el TAC. En este instante, el TAC envía un pulso proporcional al tiempo entre ambos eventos a un contador analógico digital siendo almacenado como una cuenta en el canal correspondiente a ese tiempo dentro de un analizador multicanal (*Multichannel Analyser*, MCA). Este proceso se repite hasta que un elevado número de fotones (generalmente suelen ser 10^4) ha sido detectado en el máximo del perfil de decaimiento. El resultado es una representación del número de fotones detectados frente al número de canales o tiempos, que es proporcional al perfil de decaimiento temporal de la intensidad de fluorescencia.

Además de detectar el decaimiento de la muestra, es necesario obtener el perfil de la lámpara debido a que el pulso de excitación tiene una cierta anchura, es decir no es instantáneo. Para ello se medirá una disolución difusora (Ludox) en las mismas condiciones de la muestra. El decaimiento de la fluorescencia real de la muestra se obtendrá corrigiendo el perfil experimental obtenido, sustrayendo, de alguna manera, la contribución perteneciente al decaimiento de la lámpara. Este proceso se consigue mediante un procedimiento matemático llamado *deconvolución*.³

El objetivo es obtener una función matemática que describa las curvas experimentales. Si $L(t)$ es el perfil temporal de la lámpara y $R(t)$ el decaimiento de fluorescencia observado, debemos obtener la función que describe el perfil real de la muestra, $F(t)$, a partir de los datos anteriores, sabiendo que $R(t)$ se obtiene por la convolución de $L(t)$ y $F(t)$.

$$R(t) = \int_0^t L(t')F(t-t')dt' \quad 6.2$$

siendo t' el instante de la excitación. El pulso de la lámpara se puede considerar formado por un número elevado de pulsos infinitesimales de tiempo t_i y anchura Δt , siendo ésta

mucho menor que el tiempo de decaimiento de la muestra. Cada pulso individual inducirá un pulso de respuesta en la muestra

$$R_i(t) = L(t_i) \Delta t F(t - t_i) \quad t > t_i \quad 6.3$$

Siendo t_i el tiempo de la excitación. La medida de decaimiento será la suma de todos estos pulsos individuales.

$$R(t) = \sum_{t=0}^{t=t_i} L(t_i) F(t - t_i) \Delta t \quad 6.4$$

Para deconvolucionar esta curva experimental, se asume a priori una ley matemática que describa el decaimiento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. En la mayoría de los casos, este decaimiento puede ser descrito a través de una función multiexponencial del tipo:⁴

$$F(t) = \sum_i A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad 6.5$$

siendo A_i el factor preexponencial que representa la contribución de la componente de tiempo de vida τ_i a la curva experimental.

Se han propuesto varios métodos para estimar el valor de la función $F(t)$ a partir de la medida de la curva de decaimiento $R(t)$ y del perfil de la lámpara $L(t)$. Entre todos ellos, hemos utilizado el método de mínimos cuadrados ya que proporciona buenos resultados para la mayoría de nuestros objetivos. En este método, conocido el perfil de la lámpara, la integral de convolución se calcula a partir de valores estimados de A_i y τ_i . El valor calculado de esta manera se compara con el experimental variándose los valores de A_i y τ_i de manera iterativa hasta obtener el mejor ajuste. La bondad del ajuste se puede obtener mediante el parámetro χ^2 . El valor de χ^2 es la suma pesada de los cuadrados de las desviaciones entre los puntos experimentales y los puntos calculados en la función a ajustar.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{1}{R(t_i)} [R(t_i) - R_c(t_i)]^2 \quad 6.6$$

Un buen ajuste se obtiene cuando el valor de χ^2 es inferior a 1.3. El rigor del ajuste también se puede confirmar mediante el análisis de residuales.¹

6.1.2 Espectrofotómetro de Dicroísmo Circular

Los experimentos de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jasco J-715. Todas las medidas se realizaron con cubetas de cuarzo, de paso de luz entre 1 mm y 10 cm según el coeficiente de absorción molar de la muestra empleada y la concentración requerida. La termostatación se realizó mediante un sistema Peltier para una regulación rápida y precisa de la temperatura.

Para obtener el espectro de DC es necesario medir ΔA , es decir, la diferencia entre la absorbancia de la muestra cuando se le excita con luz circularmente polarizada hacia la derecha, A_R , y hacia la izquierda, A_L . El esquema básico del montaje experimental utilizado se muestra en las Figuras 6.6 y 6.7. Como fuente de radiación se emplea una lámpara de Xe. La luz emitida se hace converger mediante un espejo y pasa por un sistema de doble monocromador. Este sistema es indispensable para las medidas de dicroísmo circular, ya que reduce la luz dispersa. El instrumento emplea un conjunto de prismas con diferente orientación axial que hace que la luz además de monocromática, sea linealmente polarizada y oscile en dirección horizontal. Esta radiación se modula mediante un dispositivo llamado modulador electro-óptico, que básicamente consiste en un cristal que transmite la luz circularmente polarizada a la izquierda o hacia la derecha dependiendo de la polaridad del campo eléctrico oscilante al que se vea sometido. Cuando la radiación atraviesa la muestra a medir, la intensidad transmitida se detecta mediante un fotomultiplicador.

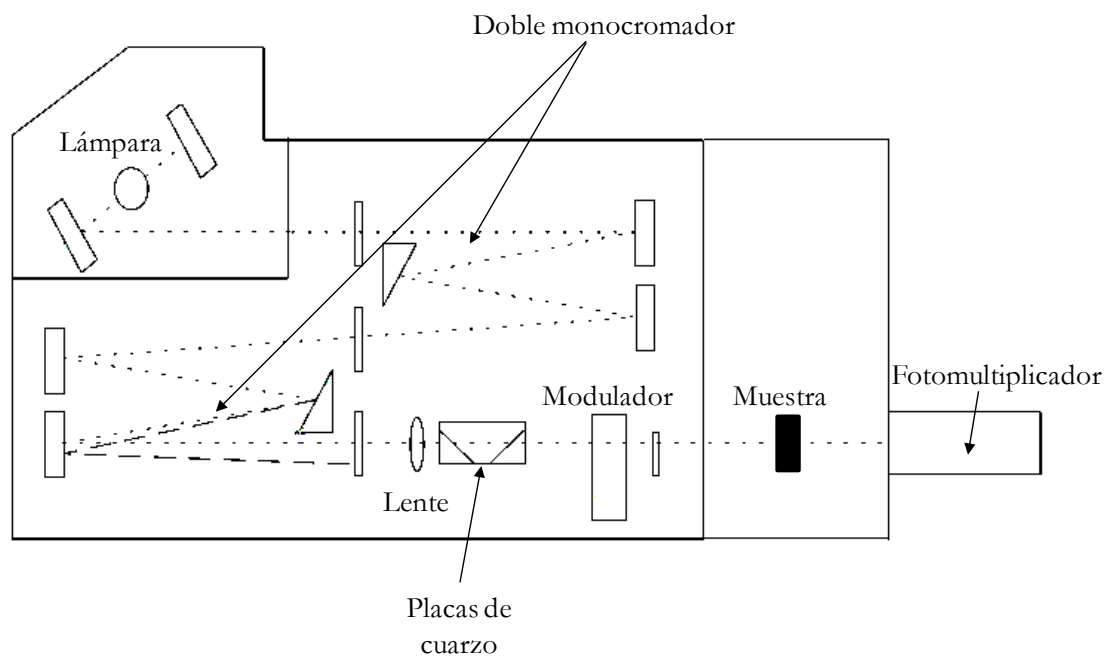


Figura 6.6. Diagrama de un espectrofotómetro de DC.

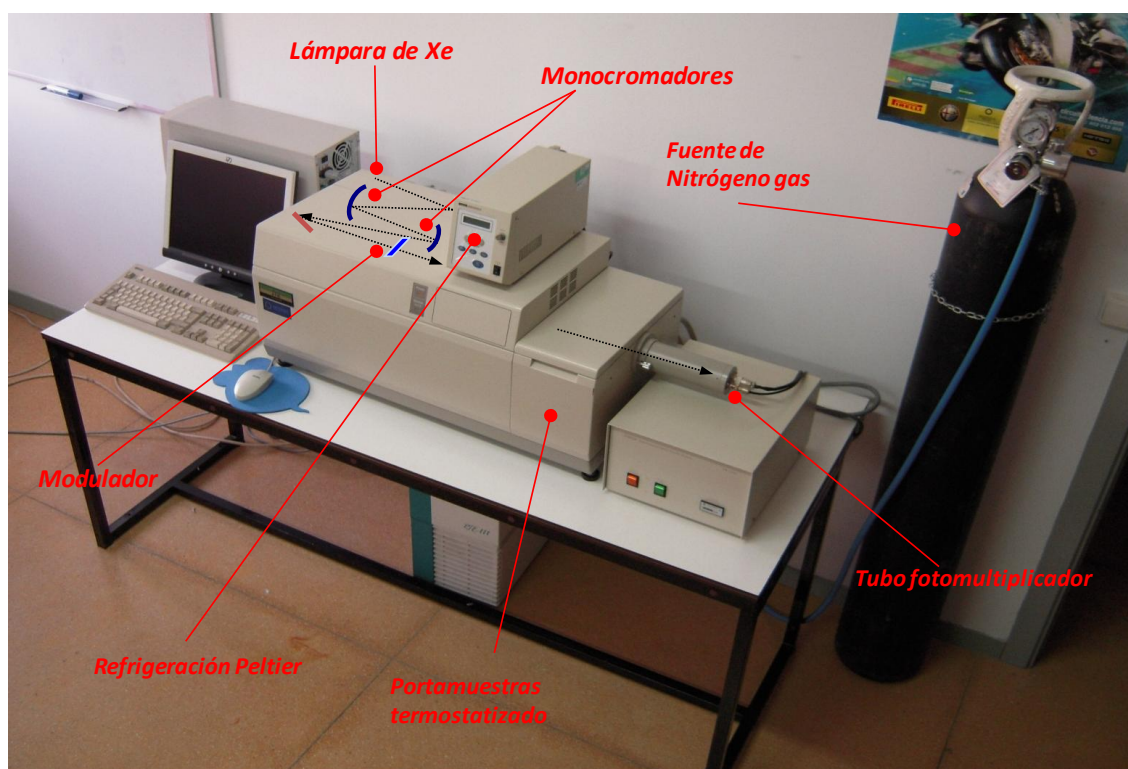


Figura 6.7. Espectrofotómetro de DC y esquema de las partes que lo conforman.

La realización de la medida es, a grosso modo, como sigue: se selecciona una longitud de onda determinada y una cierta polaridad del campo, de forma que el modulador transmita, por ejemplo, luz circularmente polarizada hacia la izquierda; esta radiación atraviesa la muestra y el fotomultiplicador detectará una cierta intensidad, a partir de la cual se puede calcular A_L ; se invierte la polaridad del campo, con lo que el modulador transmite luz circularmente polarizada hacia la derecha y obtenemos, del mismo modo, A_R ; restando ambas magnitudes y representando su diferencia frente a λ tenemos un punto del espectro. Seleccionando otra longitud de onda se repite el proceso y así sucesivamente hasta obtener finalmente un espectro de dicroísmo circular completo.⁵

Toda la parte óptica del instrumento, se encuentra bajo una atmósfera inerte de nitrógeno. Cuando usamos radiaciones próximas al ultravioleta se produce la formación de ozono a partir del oxígeno del aire. Debido a que el ozono es un fortísimo oxidante, podría deteriorar espejos, lentes, etc. reduciendo en gran medida, el tiempo de vida del instrumento. Por lo tanto, hay que evitar que se produzca eliminándolo del sistema por medio de una corriente de nitrógeno.

6.1.3 Espectrofotómetro UV-Vis

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Pelkin Elmer Lambda 35 de doble haz y doble lámpara (deuterio y halógeno tungsteno, con cambio automático) para cubrir todo el intervalo de longitud de onda desde 190 nm a 1100 nm. Las muestras fueron termostatzadas utilizando un baño termostático Thermomix BU.

Este instrumento se empleó para la comprobación de absorbancias, realización de rectas de calibrado, obtención del coeficiente de absorción molar e identificación de bandas correspondientes a determinadas transiciones electrónicas de los sistemas de estudio.

6.2 Sistemas de estudio y materiales utilizados

6.2.1 Ciclodextrinas (CDs)

Ciclodextrinas Comerciales

Las ciclodextrinas hidroxipropiladas (HPCD) fueron las (2-hidroxipropil)-ciclodextrinas cuyo grado de sustitución era de 0.6, y sus pesos moleculares fueron de

~1180, ~1400, ~1580 g/mol para α -, β - y γ HPCD respectivamente. El contenido en agua, que se tuvo en cuenta en la preparación de las disoluciones, se obtuvo mediante análisis de Karl-Fisher. Dicho análisis reveló que el contenido en agua era de 7.0%, 7.1% y 6.6% para la α -, β - y γ HPCD respectivamente. Fueron adquiridas a través de Sigma-Aldrich y utilizadas sin ningún tipo de purificación adicional.

Ciclodextrinas de Nueva Síntesis

Estas ciclodextrinas fueron sintetizadas y suministradas por el grupo de la Prof.^a Carmen Ortiz Mellet del Dpto. Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y del Prof. José Manuel García Fernández del Grupo de Síntesis Orgánica y Reconocimiento Molecular del CSIC (Sevilla). Se tratan de las α -, β - y γ CDs permetiladas (serán nombradas como $m\alpha$ CD, $m\beta$ CD y $m\gamma$ CD, respectivamente, a lo largo de la presente Memoria) y de las mismas permetiladas sustituidas por un ligando bidentado tipo xilileno ($Xm\alpha$ CD, $Xm\beta$ CD y $Xm\gamma$ CD) o naftaleno ($Nm\alpha$ CD, $Nm\beta$ CD y $Nm\gamma$ CD) en la posición 2 y 3 de una de las unidades de glucopiranosita situada en la cara secundaria. La síntesis de estas CDs se realizó siguiendo el procedimiento ya descrito en la bibliografía.^{6,7}

6.2.2 Moléculas huésped

Las sondas fluorescentes empleadas en el Capítulo 7 fueron un diéster derivado del ácido 2,3-natalenodicarboxílico, el 2,3- naftoato de dimetilo (23DMN) y un monoéster derivado del ácido 1-naftalenocarboxílico, el 1-naftoato de metilo (1MN); en el Capítulo 10 también se utilizó el 2-naftoato de metilo (2MN). Tanto el 23DMN como los 1MN y 2MN fueron compuestos comerciales (Aldrich) con una pureza superior al 99% y se utilizaron sin ningún tipo de purificación adicional.

También se realizaron experimentos de complejación con compuestos modelo de las ciclodextrinas modificadas, Xm CDs y Nm CDs. Así, se utilizaron el 1,2-bis(metoximetil)benceno (oXy) y el 1,8-bis(metoximetil)naftaleno (oNy) para las Xm CDs y Nm CDs, respectivamente. También fueron sintetizados y proporcionados por los grupos de los Profs. Carmen Ortiz Mellet y José Manuel García Fernández.

6.2.3 Disolventes

Los disolventes empleados fueron:

- Metanol. CH₃OH. Aldrich. Pureza >99%. Grado espectrofotométrico.

- Etanol. C_2H_5OH . Aldrich. Pureza 99.9%. Grado espectrofotométrico.
- Propanol. C_3H_7OH . Aldrich. Pureza >99%. Grado espectrofotométrico
- Butanol. C_4H_9OH . Aldrich. Pureza >99%. Grado espectrofotométrico
- Pentanol. $C_5H_{11}OH$. Aldrich. Pureza >99%.
- Hexanol. $C_6H_{13}OH$. Aldrich. Pureza >98%.
- Heptanol. $C_7H_{15}OH$. Aldrich. Pureza >98%.
- Cloroformo. $CHCl_3$. Aldrich. Pureza >99%. Grado espectrofotométrico.
- Diclorometano $CHCl_2$. Aldrich. Pureza >99.5%. Grado espectrofotométrico.
- Ciclohexano. C_6H_{12} . Aldrich. Pureza >99%. Grado espectrofotométrico.
- Hexano. C_6H_{14} . Aldrich. Pureza >99%.
- Agua. Milli-Q. Desionizada.

6.3 Preparación de las disoluciones

Experimentos sobre el estudio de complejos de inclusión mediante DC

Para el estudio de complejos de inclusión con ciclodextrinas, las disoluciones de molécula huésped (sonda cromofórica) se realizaron en agua desionizada (MilliQ). La escasa solubilidad del compuesto orgánico en agua obligó a extremar las condiciones de disolución manteniendo la mezcla con agitación fuerte durante 48 horas. La disolución resultante se filtró utilizando filtros de teflón de tamaño de poro 0.5 μm (Millipore). El resultado fue una disolución acuosa saturada, que se utilizó posteriormente para preparar las disoluciones con las diferentes HPCDs. Para la técnica de DC es esencial que los compuestos absorban, pero dentro de unos límites. Si la intensidad de absorción es muy alta se puede llegar a saturar el fotomultiplicador y por tanto, obtener una medida errónea. Lo ideal, es que la absorbancia de la banda de estudio sea lo más próxima a 1 para una medida fiable de DC. Para ello, si el ϵ es muy alto o muy bajo, se puede variar la absorbancia disolviendo o concentrando la muestra, o también cambiando la longitud del paso de luz en las cubetas (existe una amplia variedad, desde 0.01 a 10 cm de paso).⁸ Para nuestros sistemas decidimos usar cubetas de 1 cm de paso óptico y diluir la concentración del huésped hasta que el valor de absorbancia en el máximo de estudio fuese el apropiado.

Las disoluciones con HPCDs se prepararon por pesada, añadiendo posteriormente 3 mL de la solución acuosa saturada de sonda previamente preparada según el procedimiento expuesto en el párrafo anterior. Estas disoluciones se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas, mediante pequeños agitadores magnéticos.

En el estudio comparativo sobre la geometría de los complejos, las cantidades de HPCDs usadas en cada caso, se tomaron en función de las constantes de complejación previamente calculadas por fluorescencia, de manera que todas las disoluciones preparadas contuviesen una fracción de especie complejada de 0.7. Con esto conseguimos que la señal de DCI obtenida dependa únicamente de la geometría del complejo de inclusión que se genera y no de la cantidad de complejo formado (ya que en todos los experimentos es la misma 0.7), dándonos idea de su estructura tridimensional.

Experimentos sobre el estudio de agregación de ciclodextrinas modificadas con grupo xilileno

Las disoluciones fueron preparadas por pesada usando como disolvente agua Milli-Q y dejando agitar al menos ~24 horas antes de realizar medidas. Los intervalos de concentraciones para $Xm\alpha CD$, $Xm\beta CD$ y $Xm\gamma CD$ fueron 0.051-4.244 mM, 0.047-9.311 mM y 0.0586-13.897 mM respectivamente. El uso de concentraciones mayores a las preparadas, tiene como resultado la aparición de precipitado blanquecino. No obstante, todas las medidas fueron realizadas con disoluciones perfectamente transparentes. Es importante señalar, que una característica de las ciclodextrinas metiladas, ya sean $XmCD$ o mCD , es que su solubilidad disminuye a medida que aumenta la temperatura (coeficiente de solubilidad negativo).⁹⁻¹¹

Para el estudio de la complejación (heteroasociación) de oXy ($XmCD$) con mCD , la concentración de oXy ($XmCD$) se mantuvo constante y se varió la de mCD para cada una de las disoluciones. En este caso, el intervalo de concentraciones de mCD utilizado estuvo comprendido entre 0-10 mM y las concentraciones de oXy y de $XmCD$ se fijaron a $\sim 10^{-2}$ mM y ~ 0.047 mM respectivamente.

Experimentos sobre el estudio de agregación de ciclodextrinas modificadas con el grupo naftaleno

Las disoluciones fueron preparadas por pesadas empleando como disolvente agua Milli-Q y se dejaron agitar al menos ~24 horas antes de realizar las medidas. El intervalo de concentraciones fue de 0.005 a 5.0 mM para $Nm\alpha CD$, de 0.002 a 0.4 mM para $Nm\beta CD$ y de 0.006 a 5.4 mM para $Nm\gamma CD$.

En las disoluciones empleadas para el estudio de complejación y heteroasociación con mCD , se utilizó un intervalo de concentraciones más amplio llegando a 10 mM,

11 mM y 8 mM para las $m\alpha$ -, $m\beta$ - y $m\gamma$ CDs respectivamente. En todas ellas se mantuvo constante la concentración del cromóforo, ya fuera oNy ($\sim 10^{-2}$ mM) o NmCD (para Nm α - y Nm γ CDs fueron de ~ 0.02 mM y para la Nm β CD de ~ 0.2 mM)

Para los experimentos de dicroísmo circular se prepararon disoluciones ~ 0.2 mM para los tres tipos de NmCDs en agua, en mezclas de metanol-agua y en diferentes alcoholes. Además, los compuestos derivados del adamantano, el 1-adamantanocarboxilato de sodio (AC) y cloruro de 1-adamantilamina (AA) fueron empleados como moléculas huésped para el estudio sobre la accesibilidad al interior de la cavidad de las diferentes NmCDs. Estos compuestos fueron añadidos en exceso a las disoluciones anteriores (aproximadamente 8 veces más que la concentración de NmCD de ~ 1.6 mM).

Experimentos sobre el estudio de complejos de inclusión con una sonda fluorescente con ciclodextrinas permetiladas y las mismas modificadas con grupo xilileno

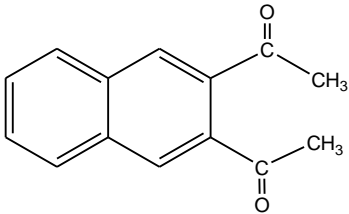
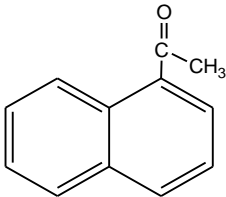
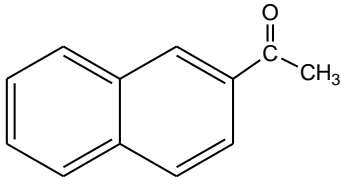
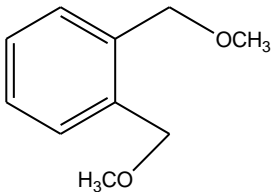
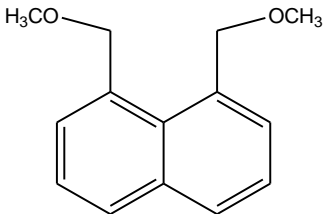
Las disoluciones de la molécula huésped, 2MN se realizaron en agua desionizada (MilliQ). La escasa solubilidad de este compuesto orgánico en agua también hizo que se mantuviera la mezcla durante 48 horas con fuerte agitación. La disolución resultante se filtró usando filtros de teflón de tamaño de poro $0.5 \mu\text{m}$ (Millipore). El resultado fue una disolución acuosa saturada de 2MN ($\sim 3 \times 10^{-5}$ M), que se utilizó posteriormente para preparar las disoluciones con las diferentes CDs.

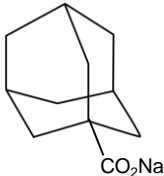
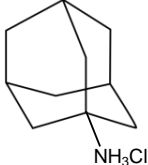
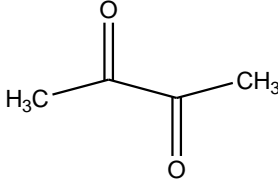
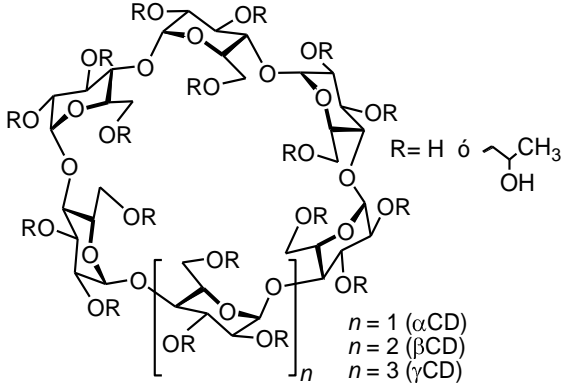
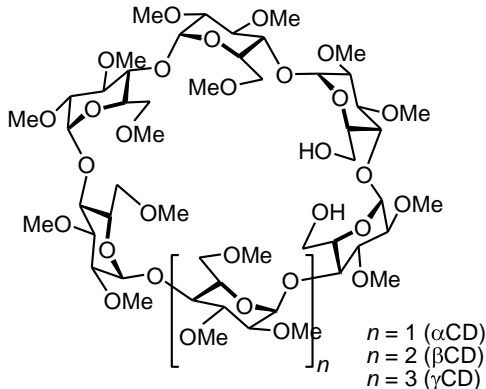
Las disoluciones acuosas de molécula huésped con CDs se prepararon pesando la CD en unos pequeños viales y añadiendo posteriormente $150 \mu\text{L}$ de la disolución acuosa saturada de 2MN previamente preparada. Estas disoluciones se dejaron agitar a temperatura ambiente durante 24 horas mediante pequeños agitadores magnéticos. Después de este tiempo, se trasvasó el contenido de los viales a las cubetas. El intervalo de concentraciones fue entre 0 y 3.5 mM para las disoluciones con X $m\alpha$ CD y entre 0 y 10 mM para todas las demás, ya sean X $m\beta$ -, X $m\gamma$ CDs o cualquiera de las mCDs.

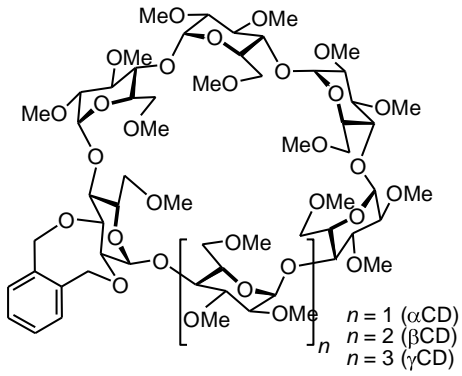
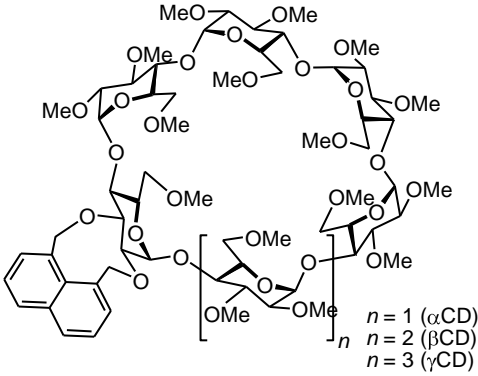
Experimentos de desactivación de fluorescencia

El desactivador empleado fue la 2,3-butadiona (diacetil, Aldrich). Se prepararon disoluciones con una concentración determinada de CD y se fueron añadiendo pequeñas cantidades de 2,3-butadiona.

6.4 Glosario de compuestos utilizados

Estructura	Nombre	Abreviatura
Moléculas Huésped		
	2,3- naftoato de dimetilo	23DMN
	1-naftoato de metilo	1MN
	2-naftoato de metilo	2MN
Cromóforos Modelo		
	1,2-bis(metoximetil)benceno	oXy
	1,8-bis(metoximetil)naftaleno	oNy

Derivados de Adamantano		
	1-adamantanocarboxilato de sodio	AC
	cloruro de 1-adamantilamina	AA
Experimentos de desactivación		
	2,3-butadiona	
Ciclodextrinas		
	(2-hidroxipropil)-ciclodextrina	HPCD
	per- <i>O</i> -Me-ciclodextrina	<i>m</i> CD

 <p> $n = 1$ (αCD) $n = 2$ (βCD) $n = 3$ (γCD) </p>	<p>2^I,3^I-O-(<i>o</i>-xilileno)-per-O-Me-ciclodextrina</p>	<p>XmCD</p>
 <p> $n = 1$ (αCD) $n = 2$ (βCD) $n = 3$ (γCD) </p>	<p>2^I,3^I-O-(1,8-naftaleno)-per-O-Me-ciclodextrina</p>	<p>NmCD</p>

6.5 Referencias

- (1) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Nueva York, 2008.
- (2) Lakowicz, J. R. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer: Nueva York, 2008; pp 27.
- (3) Lakowicz, J. R. Time-Domain Lifetime Measurements. En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer: Nueva York, 2008; pp 97.
- (4) O'Connor, D. V.; Ware, W. R.; Andre, J. C. *J. Phys. Chem.* **1979**, 83, 1333.
- (5) Tarazona, M. P.; Saiz, E. *Afinidad* **1979**, 36, 208.
- (6) Balbuena, P.; Lesur, D.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Commun.* **2007**, 3270.
- (7) González-Álvarez, M. J.; Méndez-Ardoy, A.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Photochem. Photobiol. A* **2011**, 223, 25.

- (8) Krois, D.; Brinker, U. H. Circular Dichroism of Cyclodextrin Complexes. En *Cyclodextrins and Their Complexes*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008; pp 289.
- (9) Aree, T.; Hoier, H.; Schulz, B.; Reck, G.; Saenger, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 897.
- (10) Jeffrey, G. En *Comprehensive supramolecular chemistry*; 3rd ed.; Atwood, J., Davies, J., MacNicol, D., Vögtle, F., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1996; Vol. 6.
- (11) Starikov, E. B.; Brasicke, K.; Knapp, E. W.; Saenger, W. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 336, 504.

Estudio de Dicroísmo Circular Aplicado a Complejos de Inclusión

7.1 Introducción

Este capítulo resume la puesta a punto de un instrumento de dicroísmo circular (JASCO-715) y su aplicación en el campo de los fenómenos de inclusión. Aunque esta técnica se haya usado, como veremos más adelante, en el estudio de fenómenos de asociación de ciclodextrinas modificadas, durante la puesta en marcha del mismo, se estudiaron procesos de complejación de algunas ciclodextrinas comerciales con derivados del naftaleno.

En primer lugar se llevó a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica de los fundamentos teóricos de la técnica de Dicroísmo Circular Inducido (DCI) y su aplicación en el estudio de complejos de inclusión,¹ centrándonos en las ciclodextrinas, como molécula anfitrión y en derivados del naftaleno, como moléculas huésped. Los derivados de naftaleno utilizados son cromóforos cuya fotofísica ha sido ampliamente estudiada por el grupo.²⁻⁹ En concreto, se procedió al estudio de la complejación del 2,3-naftoato de dimetilo (23DMN)^{1,10} y el 1-naftoato de metilo (1MN),¹¹ con las 2-hidroxipropil α -, β - y γ -ciclodextrinas (HPCD).

7.2 Estudio de complejos de inclusión del 2,3-naftoato de dimetilo con α -, β - y γ HPCDs

7.2.1 Resultados por Fluorescencia y Mecánica Molecular

Mediante el estudio por fluorescencia obtuvimos los espectros de excitación, emisión, medidas de anisotropía, desactivación (quenching) y decaimiento de tiempo de vida a diferentes concentraciones de HPCDs y distintas temperaturas.¹⁰

Los espectros de emisión de los esteres ácidos naftaleno mono- o dicarboxílicos, como el 23DMN, se caracterizan por presentar dos bandas típicas,^{2,5} tal y como se muestra en la Figura 7.1. La relación de intensidades entre dichas bandas (R) tiene la particularidad de ser muy sensible a la polaridad del medio. Puesto que la complejación en medio acuoso supone un cambio drástico en la polaridad del entorno que rodea al cromóforo huésped, al pasar del seno de la disolución al interior de la cavidad más hidrofóbica, la variación de R con la [HPCD] añadida, permite estudiar los equilibrios de complejación y obtener constantes de equilibrio y estequiometrías de los complejos

formados. Además, el valor de R cuando la $[HPCD] \rightarrow \infty$ se denomina R_∞ y se emplea para estimar la polaridad en el interior de la cavidad.

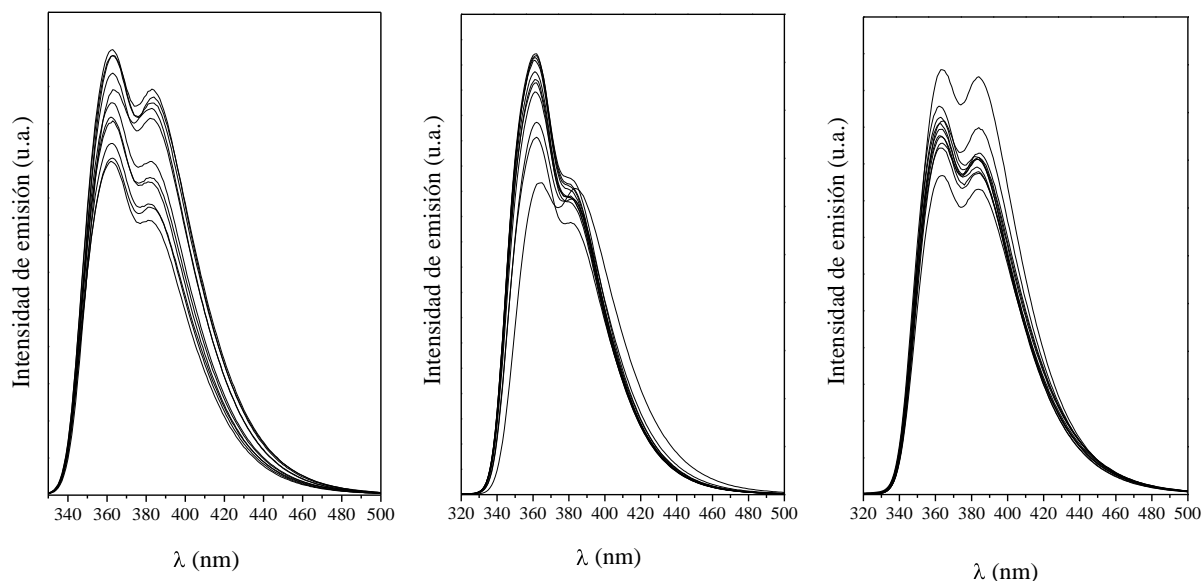


Figura 7.1. Espectros de emisión del 23DMN en ausencia y presencia de α - (izquierda), β - (medio) y γ HPCD (derecha) a 25°C.

Tomando disoluciones de 23DMN en diferentes disolventes de polaridad conocida y obteniendo la relación de bandas de los espectros de emisión, se realiza una curva de calibrado R en función de la polaridad (ϵ) (Figura 7.2.a). Para el 23DMN la función de $R(\epsilon)$ obtenida a 25°C es:

$$R = 0.55 + 5.32 \times 10^{-4} \epsilon + 6.14 \times 10^{-5} \epsilon^2 \quad 7.1$$

Interpolando el valor de R_∞ obtenido para nuestros complejos en dicha curva, podemos estimar la polaridad del medio que rodea al cromóforo en cada tipo de HPCD.

Las medidas de decaimiento de fluorescencia también pueden dar información de la estequiometría y las constantes de formación. La complejación implica no sólo cambios en la polaridad, como se indicó anteriormente, sino también en la microviscosidad del medio que rodea al cromóforo (Figura 7.2). El tiempo de vida suele ser también sensible a esa microviscosidad y puede aportar información sobre el proceso de inclusión.

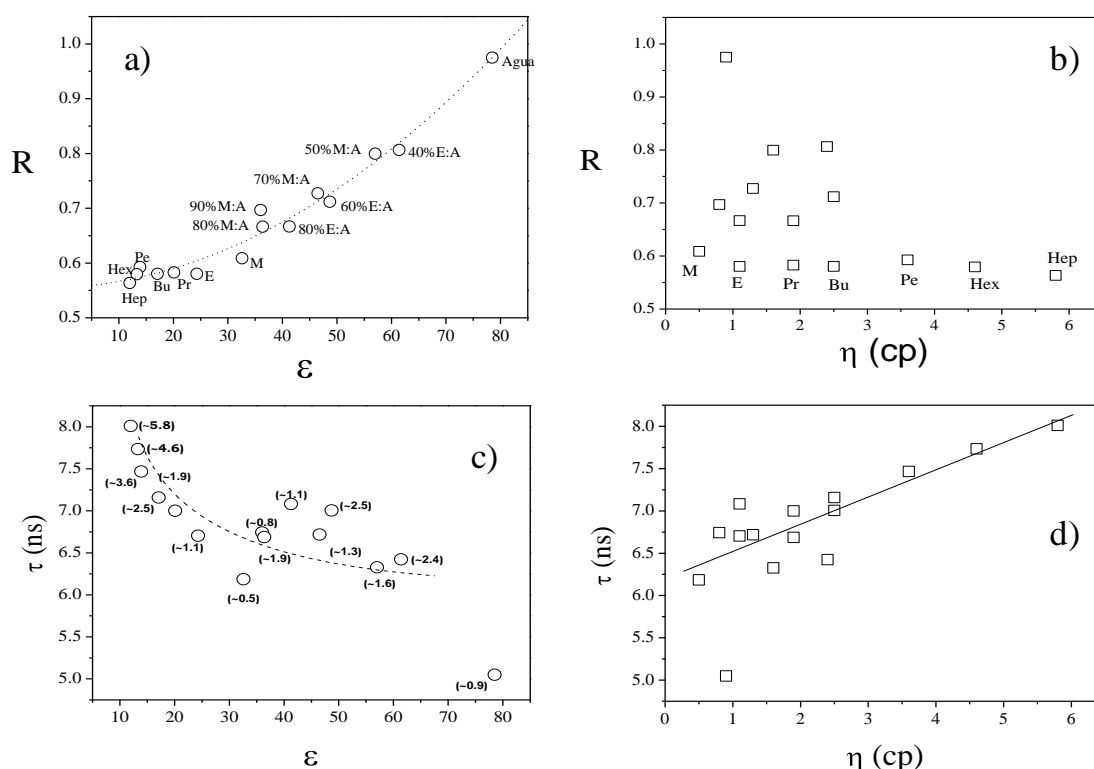


Figura 7.2. Cambios en R y τ para el 23DMN en diferentes disolventes a 25°C. Los disolventes fueron: mezclas de metanol:agua y etanol:agua (%v:v) y de n-alcoholes desde metanol a heptanol. Viscosidad de los disolventes (en cp) a 25°C indicada entre paréntesis en la gráfica c).

La anisotropía (r), obtenida a partir de las medidas de polarización de fluorescencia, es una propiedad que depende de la concentración de HPCD y de la temperatura. Está relacionada con la estructura del complejo, el tamaño relativo de la molécula huésped y la ciclodextrina, y las posibles interacciones entre ambas, que podrían limitar el movimiento del huésped dentro de la HPCD. Si se asume que el complejo se mueve como una unidad rígida, el valor de r debería ser proporcional al tamaño del complejo. Si, por el contrario, hay algún tipo de movimiento de la molécula huésped en el interior de la cavidad, el valor de r disminuiría a medida que aumenta el tamaño de la cavidad.⁵

Los experimentos de desactivación también pueden proporcionar información sobre la localización de la molécula huésped en el complejo, pues representan una medida de la accesibilidad del mismo.

La Tabla 7.1 muestra los valores de las constantes de complejación (K) obtenidas a varias temperaturas a partir del ajuste de los datos experimentales de R vs [HPCD] a la ecuación no lineal:

$$R = \frac{R_0 + R_\infty K \Phi [\text{HPCD}]_0}{1 + K \Phi [\text{HPCD}]_0} \quad 7.2$$

o bien en forma lineal:

$$\frac{1}{R_0 - R} = \frac{1}{R_0 - R_\infty} + \frac{1}{K \Phi (R_0 - R_\infty) [\text{HPCD}]_0} \quad 7.3$$

Tabla 7.1. Constantes de asociación K y los valores de R_∞ para 23DMN/ α HPCD, 23DMN/ β HPCD y 23DMN/ γ HPCD a diferentes temperaturas.

T (°C)	23DMN/ α HPCD		23DMN/ β HPCD		23DMN/ γ HPCD	
	K (M ⁻¹)	R_∞	K (M ⁻¹)	R_∞	K (M ⁻¹)	R_∞
5	211 ± 23	0.780 ± 0.004	1670 ± 88	0.693 ± 0.001	61 ± 15	0.834 ± 0.016
15	166 ± 24	0.782 ± 0.006	1283 ± 63	0.686 ± 0.001	55 ± 16	0.825 ± 0.012
25	164 ± 34	0.786 ± 0.008	1084 ± 66	0.683 ± 0.001	86 ± 18	0.831 ± 0.006
35	150 ± 39	0.789 ± 0.011	1020 ± 50	0.681 ± 0.001	108 ± 14	0.828 ± 0.004
45	152 ± 55	0.831 ± 0.011	829 ± 47	0.677 ± 0.001	114 ± 18	0.822 ± 0.004

Los valores de K obtenidos por ambos métodos fueron muy similares y la Tabla 7.1 indica el valor medio de ambos. Se observa que la molécula huésped 23DMN forma complejos con α -, β - y γ HPCDs con estequiometría 1:1, siendo las constantes de estabilidad del complejo 23DMN/ β HPCD a todas las temperaturas ($K=1084 \pm 66$ M⁻¹ a 25°C) bastante mayores que para el complejo formado con α HPCD (164 ± 34 M⁻¹ a 25°C) o con γ HPCD (86 ± 18 M⁻¹ a 25°C). De los mismos ajustes se obtuvo R_∞ , que a 25°C es de 0.79, 0.68 y 0.83 para los sistemas 23DMN/ α HPCD, 23DMN/ β HPCD y 23DMN/ γ HPCDs, respectivamente. Sustituyendo el valor de R_∞ en la Ecuación 7.1 obtenemos que la constante dieléctrica para el medio que rodea al 23DMN en las ciclodextrinas α -, β - y γ HPCDs, es de 58, 41 y 63 respectivamente. Estos valores son similares a los calculados con otra sonda fluorescente (2MN) para estas mismas α -, β - y γ HPCDs (51, 44 y 56 respectivamente)² y denotan un entorno y localización muy parecidos para la molécula huésped en las diferentes HPCDs.

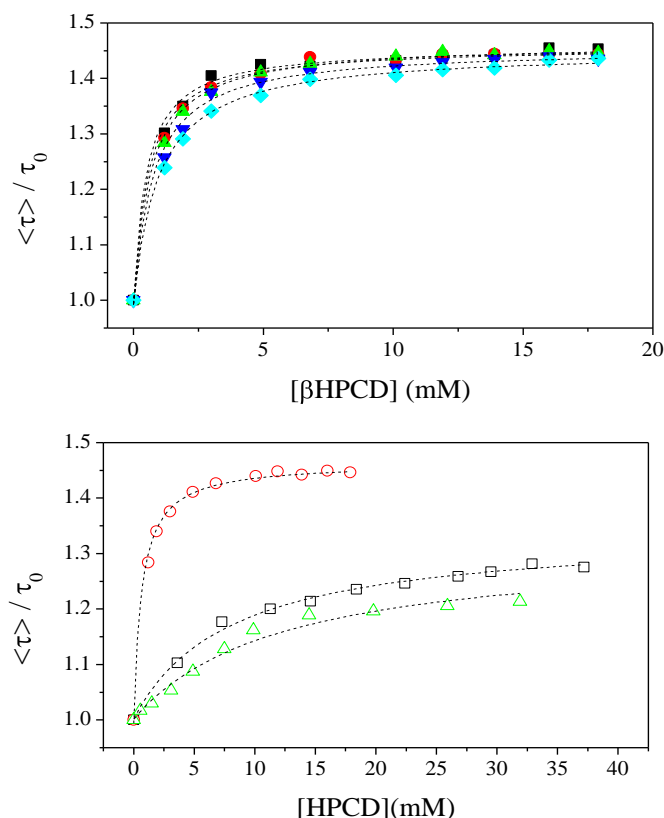


Figura 7.3. (*Superior*) Cambios en el promedio pesado del tiempo de vida medio $\langle \tau \rangle$ con la $[\beta\text{HPCD}]$ y la temperatura para 5 °C (■); 15 °C (●); 25 °C (▲); 35 °C (▼) y 45 °C (◆). (*Inferior*) variación del tiempo de vida medio $\langle \tau \rangle$ con $[\alpha\text{HPCD}]$ (□), $[\beta\text{HPCD}]$ (○) y $[\gamma\text{HPCD}]$ (△) a 25 °C. El ajuste de las curvas a los datos experimentales se realizó aplicando la Ecuación 7.5 a partir de los valores de Φ obtenidos del estado estacionario.

Tanto para el 23DMN libre, como para las disoluciones de 23DMN con α -, β - y γ HPCDs obtuvimos los perfiles de decaimiento de tiempo de vida a diferentes temperaturas. Los resultados indicaron un decaimiento monoexponencial para el 23DMN libre, caracterizado por un tiempo de vida de alrededor de ~ 5 ns que apenas cambia con la temperatura; y un decaimiento biexponencial para las disoluciones de 23DMN/HPCDs, con dos componentes, una de un tiempo de vida corto (~ 5 ns), correspondiente al cromóforo libre y otra mucho más lenta, cuyo valor depende de la HPCD empleada y de la temperatura. La Figura 7.3 muestra la variación del promedio pesado del tiempo de vida medio relativo al del cromóforo libre con la $[\text{HPCD}]$ para la βHPCD a varias temperaturas y para los tres sistemas 23DMN/HPCDs a 25 °C. El promedio pesado (o simplemente promedio del tiempo de vida) de un perfil de decaimiento de fluorescencia que se ajusta a una multiexponencial (Capítulo 6, Ecuación 6.5) se define mediante la expresión:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i} \quad 7.4$$

donde A_i es el factor preexponencial de la componente de tiempo de vida τ_i de la función multiexponencial a la que se ajusta el decaimiento de la intensidad de fluorescencia. En el caso de dos componentes, obviamente $n=2$; si el decaimiento es monoexponencial, como el cromóforo 23DMN libre, $\langle \tau \rangle = \tau_0$.

Las curvas que se representan en la Figura 7.3, se obtienen del ajuste de los resultados experimentales a la Ecuación 7.5, con los valores de Φ obtenidos de los datos de estado estacionario, para un complejo de estequiometría 1:1:

$$\frac{\langle \tau \rangle}{\tau_0} = \frac{1 + \frac{\tau_\infty}{\tau_0} K \Phi [\text{HPCD}]_0}{1 + K \Phi [\text{HPCD}]_0} \quad 7.5$$

Las constantes de complejación son muy similares a las obtenidas a partir de los datos de R, siendo a 25°C 180 ± 17 , 930 ± 35 , $115 \pm 24 \text{ M}^{-1}$ para la complejación de 23DMN con α -, β - y γ HPCDs respectivamente. A esta misma temperatura, los valores de τ_∞ son 6.7, 7.4 y 6.5 ns respectivamente. Del mismo modo que para el parámetro R, también se obtuvo la dependencia del tiempo de vida del cromóforo libre con la polaridad y microviscosidad (Figura 7.2.c y d). El incremento del tiempo de vida con el aumento de la [HPCD], al igual que $\tau_\infty > \tau_0$, está relacionado con un aumento de la viscosidad y una disminución de la polaridad del medio que rodea al cromóforo, que se da a medida que se produce la complejación. Seguramente el valor más alto de τ_∞ , obtenido para el 23DMN/ β HPCD, es consecuencia de la alta microviscosidad del entorno que rodea al cromóforo, al situarse incluido en una cavidad con una relativa baja polaridad.

Mediante la ecuación de van't Hoff, usando las K obtenidas a partir de los valores de R a diferentes concentraciones y temperaturas, es posible calcular parámetros termodinámicos (Tabla 7.2). Los procesos de inclusión del 23DMN con las α - y β HPCDs se ven favorecidos entálpicamente ($\Delta H^0 < 0$), mientras que con la γ HPCD el cambio es desfavorable, ($\Delta H^0 > 0$). Valores negativos indican fuerzas atractivas tipo van der Waals o puentes de hidrógeno huésped-HPCD. Valores desfavorables son consecuencia de un

fuerte debilitamiento de esas interacciones atractivas, por ejemplo, porque el tamaño de la cavidad aumente, como sucede en el caso de la γ HPCD.^{5,12}

Tabla 7.2. Valores de la entalpía y entropía obtenidos a partir de las K (Tabla 7.1).

Complejo	ΔH^0 (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^0 (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
23DMN/αHPCD	- 8 \pm 28	+ 16 \pm 9
23DMN/βHPCD	- 12.0 \pm 18	+ 18 \pm 4
23DMN/γHPCD	+ 14 \pm 3	+ 84 \pm 11

La cuantía de la penetración y de las interacciones de las ciclodextrinas con la molécula huésped, están muy relacionadas con el valor del término entrópico. Los cambios producidos en la complejación son normalmente debidos al balance de dos contribuciones:^{5,12}

1. Una desfavorable, debida a la pérdida de grados de libertad rotacionales y traslacionales al formarse el complejo. Esta contribución desfavorable se hace mayor cuanto más restringido sea el movimiento del huésped en el interior de la cavidad.

2. Una favorable, correspondiente a la pérdida de moléculas que solvatan, de manera ordenada, la molécula huésped y el interior de la cavidad de la HPCD. Esta contribución aumenta a medida que el huésped penetra más en la cavidad.

Los valores $\Delta S^0 > 0$ para los tres casos indican una inclusión del 23DMN en la cavidad de las HPCDs. De los tres tipos de HPCDs, la inclusión del 23DMN en γ HPCD es fuertemente positiva haciendo que el proceso esté gobernado entrópicamente.

En la Figura 7.4 se muestra las representaciones de Stern-Volmer realizadas para los diferentes sistemas. Las gráficas no son lineales para el intervalo de concentraciones empleado, por lo que no se pueden obtener las constantes bimoleculares o de Stern-Volmer de manera sencilla. No obstante, los resultados sugieren, lógicamente, una mayor accesibilidad del quencher al 23DMN libre; mientras que en los complejos, el huésped tiene mayor accesibilidad cuando se compleja con la α HPCD, luego con β HPCD y finalmente con γ HPCD.

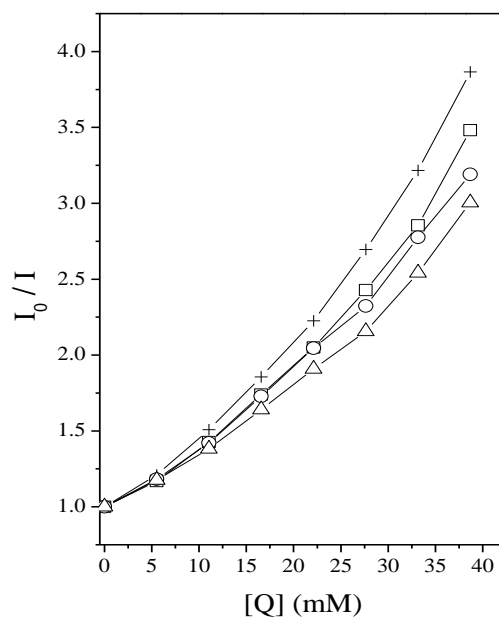


Figura 7.4. Representaciones de Stern-Volmer de intensidad de fluorescencia a 25°C usando diacetil como desactivador para disoluciones en agua de 23DMN (+), 23DMN/αHPCD (□), 23DMN/βHPCD (○) y 23DMN/γHPCD (△). Todas las disoluciones fueron realizadas a una [HPCD] que tuviera una fracción del 0.75 de huésped complejoado.

En la Figura 7.5 se indica la variación de anisotropía con la [HPCD]. Los valores de r a concentración infinita, $[HPCD] \rightarrow \infty$, nos proporcionan la anisotropía del complejo, r_∞ . El orden de r_∞ que siguen estos sistemas es: r_∞ (23DMN/γHPCD) $>$ r_∞ (23DMN/αHPCD) $>$ r_∞ (23DMN/βHPCD) $>$ r (23DMN).

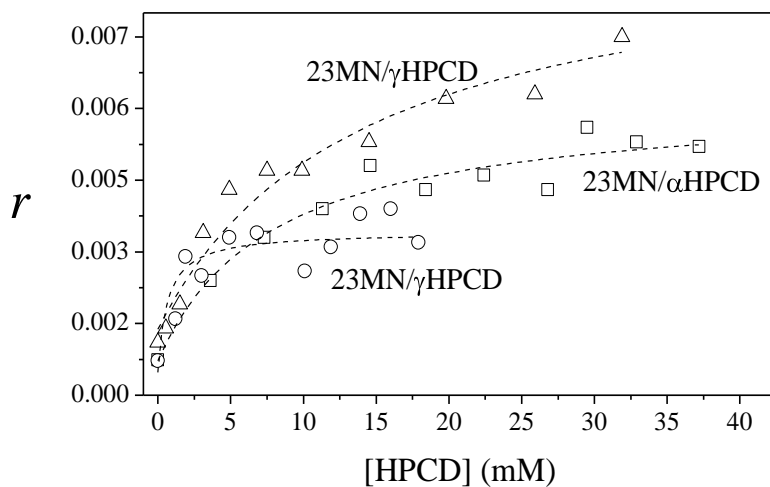


Figura 7.5. Variación de r con [αHPCD] (□), [βHPCD] (○), [γHPCD] (△) a 25°C.

Seguramente la penetración del 23DMN en la cavidad de la α HPCD (la más pequeña) no sea del todo completa (nótese el alto valor de la polaridad que rodea al 23DMN y la accesibilidad del quencher), si lo comparamos con el complejo con β HPCD y γ HPCD. Si el 23DMN estuviese situado parcialmente en el exterior y sujeto a fuertes interacciones con la α HPCD haría que el 2MN/ α HPCD se moviera como un todo, explicando el valor relativamente alto de r_∞ . En el caso de 23DMN/ γ HPCD y 23DMN/ β HPCD, la inclusión seguramente será completa y el aumento de r se debe al aumento del tamaño de la cavidad.

Se realizaron cálculos de Mecánica Molecular (MM) en el vacío y en agua para las aproximaciones del 23DMN de forma *polar* y *no polar*, con cada uno de los tres tipos de HPCDs (detalles y protocolos del cálculo descrito en el Capítulo 5).

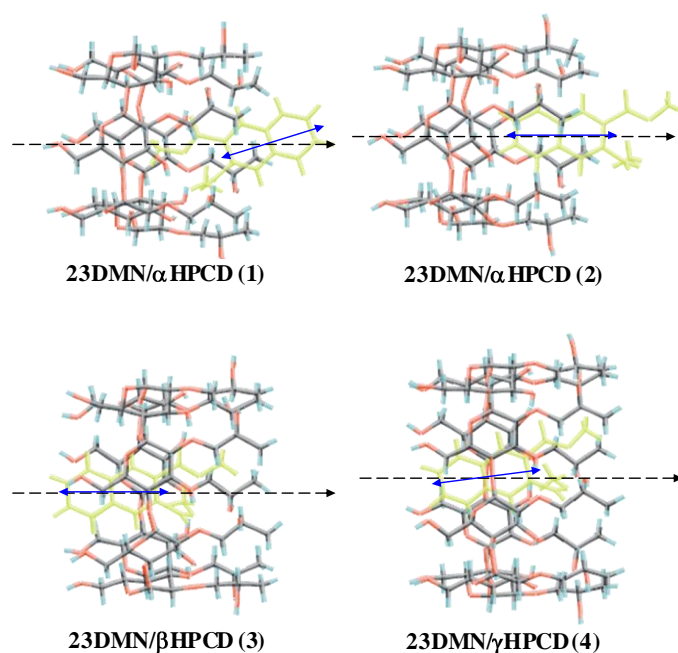


Figura 7.6. Estructuras más favorables obtenidas a partir del cálculo de MM para los complejos (1:1) 23DMN con α HPCD (1 y 2), β HPCD (3) y γ HPCD (4). Flecha punteada indica la dirección del eje principal de la HPCD. Flecha continua indica la transición electrónica 1B_b (eje más largo del naftaleno).

Estas simulaciones teóricas aportan información sobre las fuerzas responsables de la complejación y la posible geometría de los complejos formados. Los resultados muestran que la inclusión del 23DMN en la HPCDs es un proceso favorable y son las fuerzas de van der Waals las principales responsables de la complejación, mientras que las interacciones electrostáticas, son prácticamente despreciables. En el caso de la α HPCD, el reducido tamaño de la cavidad obliga a que una parte del cromóforo 23DMN

quede fuera de la HPCD y expuesto al disolvente. Este hecho no se observa cuando el 23DMN se compleja con los otros dos tipos de HPCDs, donde el huésped se sitúa en el interior de las β - o γ HPCD y queda totalmente protegido del medio exterior. Las estructuras más favorables obtenidas para los diferentes complejos se muestran en la Figura 7.6.

7.2.2 Medidas de Dicroísmo Circular

El espectro de absorción para la molécula huésped 23DMN se caracteriza por presentar tres bandas principales, situadas aproximadamente a 245, 282 y 320 nm (Figura 7.7), que se denominan, según la notación de Platt,¹³ 1B_b , 1L_a y 1L_b respectivamente. Tal y como se muestra la Figura 7.7, el momento de la transición de la banda 1B_b está polarizado a lo largo del eje mayor del grupo naftaleno y las transiciones para las bandas 1L_a y 1L_b son más o menos paralelas al eje menor de dicho grupo y, por tanto, perpendiculares a la 1B_b .^{14,15}

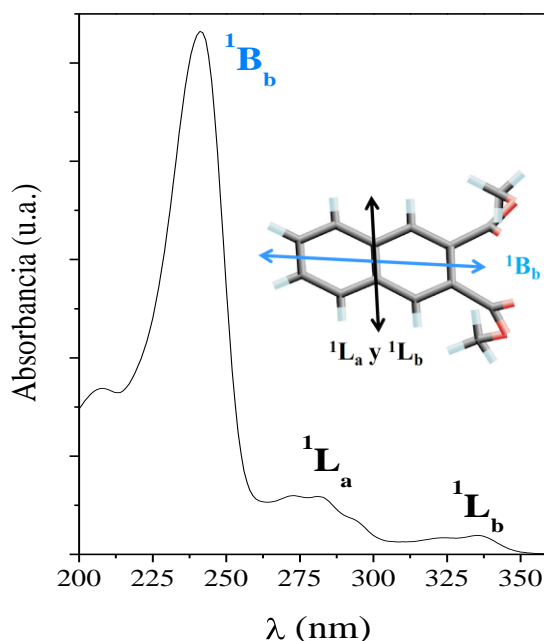


Figura 7.7. Espectro de absorción del 23DMN en agua a 25°C, indicando mediante la notación Platt, la situación de cada una de las transiciones observadas. Superpuesta, la estructura del 23DMN mostrando las direcciones de cada uno de sus momentos electrónicos de la transición.

La Figura 7.8 presenta los espectros de DCI a 25°C para el 23DMN libre y para las disoluciones en agua de 23DMN/HPCDs. El espectro está comprendido en el intervalo de

longitudes de onda que corresponde a la banda más intensa en absorción, la transición 1B_b . Para el 23DMN en ausencia de HPCD, como se esperaría al ser un compuesto aquiral, no se observa ningún tipo de banda, siendo la señal obtenida prácticamente cero en todo el espectro. En los espectros de DCI para 23DMN/ β HPCD y 23DMN/ γ HPCD, se muestra una banda positiva, más intensa para el complejo con β HPCD que con γ HPCD. En el caso de la disolución 23DMN/ α HPCD se obtiene una banda muy débil de signo negativo.

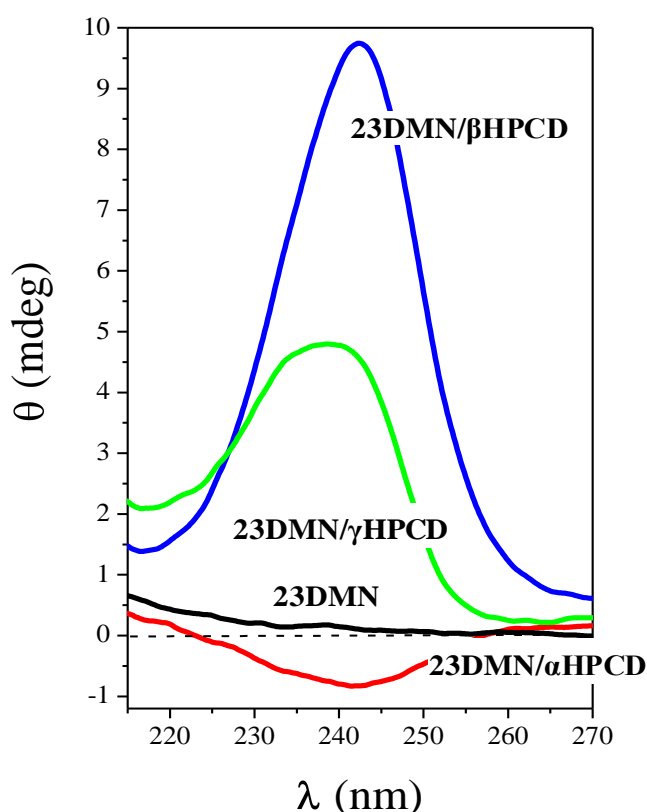


Figura 7.8. Espectro de dicroísmo circular de 23DMN libre y 23DMN en presencia de α -, β - y γ HPCD en agua a 25°C (preparadas con una [HPCD] para que la fracción de complejo formado en cada disolución sea 0.7) para la banda de absorción 1B_b .

Si por el contrario estudiamos el DCI para la transición 1L_a (~275 nm) aparece una pequeña banda negativa solo observable a altas concentraciones de 23DMN y para la disolución con β HPCD.

Como indicamos anteriormente (Capítulo 4), el signo de DCI varía en función de la mayor o menor inclusión y de la orientación del cromóforo dentro de la cavidad. Si el momento de la transición electrónica está polarizado paralelamente al eje principal de la ciclodextrina, la banda obtenida en el espectro es positiva. En caso contrario, si la

transición es perpendicular a dicho eje, la banda observada tiene signo negativo. Es importante mencionar que estas reglas se invierten si el cromóforo está parcialmente colocado fuera de la ciclodextrina (si es paralelo, el signo es negativo; si es perpendicular, el signo es positivo). Por otro lado, la intensidad está relacionada con el mejor o peor ajuste del cromóforo dentro de la cavidad.

El signo positivo en el espectro para los complejos de β - y γ HPCDs indica que el 23DMN se encuentra situado en el interior de las HPCDs y orientado de forma axial, es decir, con el eje mayor del grupo naftaleno paralelo al eje principal de la ciclodextrina. La diferencia en intensidades sugiere que el cromóforo penetra más y su movimiento está mucho más impedido para la β HPCD. Que el signo se invierta para esta ciclodextrina cuando se analiza la banda 1L_a (momento de transición a lo largo del eje menor del naftaleno) corrobora lo anteriormente mencionado. La disminución en intensidad en el espectro de la γ HPCD es resultado del incremento en el tamaño de la cavidad, lo que conlleva un peor ajuste del cromóforo en su interior y, por tanto, un mayor movimiento de éste.

El espectro de DCI respalda completamente las estructuras generadas por MM, representadas en las conformaciones 3 y 4 de la Figura 7.6, y los valores de entalpía, entropía, anisotropía y desactivación de fluorescencia obtenidos. Como se veía anteriormente, el 23DMN en la γ HPCD está acompañado por un cambio entálpico desfavorable, ($\Delta H^0 > 0$), lo que indica que las interacciones entre la molécula huésped y la anfitriona son débiles produciendo un peor ajuste del cromóforo dentro de la cavidad. En el caso de la β HPCD, la señal de DCI es la más intensa, lo que perfectamente coincide con el valor más negativo de ΔH^0 de las tres HPCD, como muestra la Tabla 7.2. El 23DMN en el interior de la cavidad experimenta fuertes interacciones con la β HPCD, lo que provoca un mejor ajuste y dificulta el movimiento del cromóforo en su interior.

La banda negativa y de baja intensidad obtenida para 23DMN/ α HPCD, también está de acuerdo con las estructuras 1 y 2 representadas en la Figura 7.6 para este complejo. Aunque la orientación del cromóforo proporcionaría un signo positivo de DCI si estuviese situado en el interior de la cavidad, el tamaño más reducido de la α HPCD hace que éste no penetre totalmente en la misma, explicando así el cambio de signo y la baja intensidad del DCI.

Como indicamos previamente (Capítulo 4), la señal dicróica también depende de la cantidad de complejo formado, por tanto, si se realiza un estudio de la intensidad en

relación con la concentración se pueden obtener constantes de asociación. De los tres tipos de ciclodextrinas, la que da una señal más intensa y es más sensible al grado de complejación es la β HPCD. La gráfica obtenida de la representación de la intensidad de la banda dicróica frente a concentración de ciclodextrina (Figura 7.9) se puede ajustar a una ecuación no lineal similar a las empleadas para fluorescencia.

Consideremos el equilibrio de complejación del 23DMN y la β HPCD con estequiometría 1:1:



la constante de complejación toma la forma:

$$K = \frac{[23\text{DMN}:\beta\text{HPCD}]}{[23\text{DMN}][\beta\text{HPCD}]} \quad 7.7$$

Supongamos que la concentración de 23DMN es constante mientras que la de β HPCD varía de tal forma que siempre $[\beta\text{HPCD}] \gg [23\text{DMN}]$ y que por lo tanto, se puede considerar $[\beta\text{HPCD}] \approx [\beta\text{HPCD}]_0$.

La señal de DCI obtenida es proporcional solamente a la cantidad de especie complejada, ya que la cantidad de huésped libre al no dar DC, no va a influir en la intensidad de la banda. Como consecuencia, tomando como parámetro cuantitativo la intensidad de la banda de DCI a ~ 240 nm, la elipticidad, θ , a esa longitud de onda vendrá dada por:

$$\theta = \theta_c = \kappa [23\text{DMN}:\beta\text{HPCD}] \quad 7.8$$

donde κ es una constante de proporcionalidad que va a depender del tipo de complejo formado, del coeficiente de extinción molar del cromóforo, de la respuesta del aparato, etc.

En ausencia de β HPCD se obtiene una elipticidad nula de la Ecuación 7.8:

$$\theta_0 = 0 \quad 7.9$$

cuando $[\beta\text{HPCD}]_0 \rightarrow \infty$, es decir cuando todo 23DMN se encuentra complejoado, la Ecuación 7.7 queda como:

$$\theta_{\infty} = K [\text{23DMN}]_0 \quad 7.10$$

donde $[\text{23DMN}]_0$ es la concentración inicial de 23DMN.

Sustituyendo las Ecuaciones 7.7 y 7.10 en la 7.8 y reorganizando los términos, se obtiene:

$$\theta = \frac{\theta_{\infty} K [\beta\text{HPCD}]_0}{1 + K [\beta\text{HPCD}]_0} \quad 7.11$$

Los datos experimentales se ajustan muy bien a la Ecuación 7.11, como indica la curva de la Figura 7.9, obteniéndose una $K = 910 \pm 50 \text{ M}^{-1}$ para 23DMN/ β HPCD a 25°C. Este resultado se acerca de forma razonable a los obtenidos por las diferentes técnicas de fluorescencia. Recordemos que los valores de K derivados mediante las medidas de estado estacionario y tiempo de vida son $1084 \pm 66 \text{ M}^{-1}$ y $930 \pm 35 \text{ M}^{-1}$, respectivamente a esa misma temperatura.

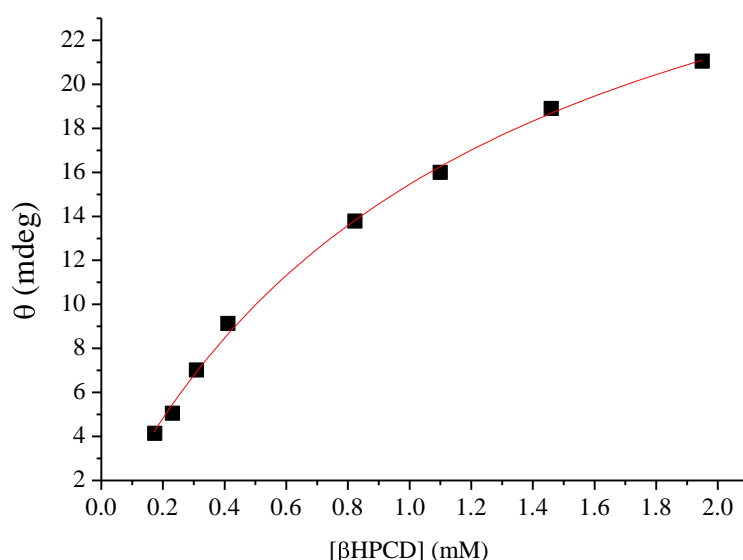


Figura 7.9. Variación de la intensidad de elipticidad (medida en el máximo de la banda $^1\text{B}_0$) respecto a la concentración de $[\beta\text{HPCD}]$ a 25°C. La curva roja indica el ajuste no lineal de la Ecuación 7.11.

7.3 Estudio de complejos de inclusión del 1-naftoato de metilo con α -, β - y γ HPCDs

7.3.1 Resultados por Fluorescencia y Mecánica Molecular

Siguiendo una metodología similar al estudio con 23DMN, hemos realizado medidas de estado estacionario y decaimiento de fluorescencia. A partir del análisis de la relación de intensidades entre las dos bandas características del espectro de emisión (Figura 7.10), se determina que la relación entre el R y ϵ obtenida en este caso es:

$$R = 0.68 + 1.1 \times 10^{-3} \epsilon + 1.8 \times 10^{-4} \epsilon^2 \quad 7.12$$

Las representaciones mediante el método de variaciones continuas¹⁶ (*Job's plot*) indican una estequiometría 1:1 para los tres tipos de sistemas, de forma análoga al ejemplo anterior de complejación del 23DMN con HPCDs. De igual forma, se determinaron las K y los valores de R_∞ a diferentes temperaturas (Tabla 7.3). Los valores de las constantes de complejación (K) a 25°C del 1MN con las α -, β - y γ HPCD fueron 76 ± 11 , 587 ± 25 y $156 \pm 11 \text{ M}^{-1}$ respectivamente, siendo en los dos primeros casos menores que con el cromóforo 23DMN. El valor de R_∞ a 25°C es de 1.04, 0.99 y 1.19 para 1MN/ α HPCD, 1MN/ β HPCD y 1MN/ γ HPCD, respectivamente. A partir de estos valores y mediante la Ecuación 7.12 hemos determinado que la polaridad que rodea al cromóforo en la cavidad de α -, β - y γ HPCD es de 47, 39 y 49 respectivamente. Estos valores se aproximan bastante a los obtenidos con el 23DMN.

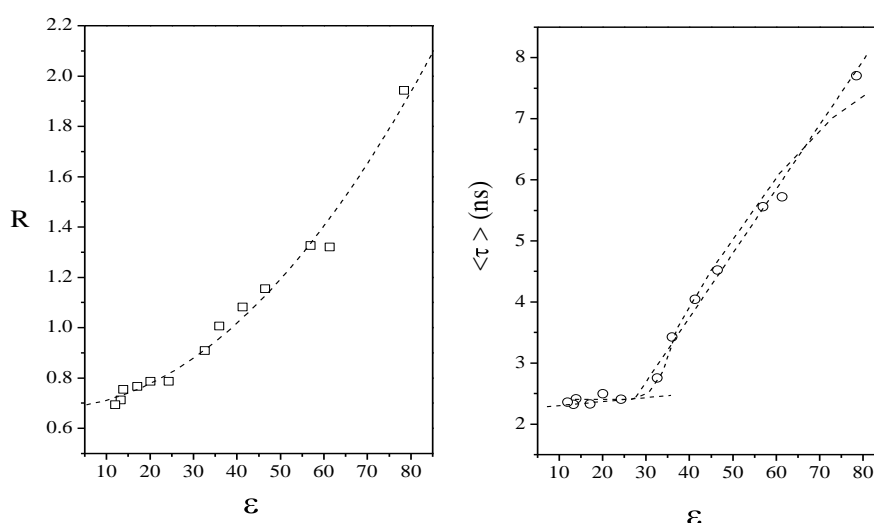


Figura 7.10. Variación de R (izquierda) y τ (derecha) para el 1MN en diferentes disolventes a 25°C. Los disolventes fueron: mezclas de metanol:agua y etanol:agua y de n-alcoholes desde metanol a heptanol.

Tabla 7.3. Constantes de asociación K y los valores de R_∞ para 1MN/ α HPCD, 1MN/ β HPCD y 1MN/ γ HPCD a diferentes temperaturas.

T (°C)	1MN/ α HPCD		1MN/ β HPCD		1MN/ γ HPCD	
	K (M ⁻¹)	R_∞	K (M ⁻¹)	R_∞	K (M ⁻¹)	R_∞
5	139 ± 19	1.12 ± 0.04	681 ± 37	0.981 ± 0.005	143 ± 13	1.20 ± 0.02
15	103 ± 11	1.07 ± 0.03	643 ± 28	0.976 ± 0.006	135 ± 11	1.20 ± 0.02
25	76 ± 11	1.04 ± 0.06	587 ± 25	0.985 ± 0.005	156 ± 11	1.19 ± 0.01
35	91 ± 12	1.21 ± 0.04	496 ± 23	0.991 ± 0.003	146 ± 14	1.16 ± 0.03
45	50 ± 7	1.12 ± 0.05	438 ± 33	0.984 ± 0.011	124 ± 10	1.19 ± 0.01

Las medidas de decaimiento de fluorescencia se realizaron para el 1MN y 1MN/HPCDs a diferentes temperaturas (Figura 7.11). El perfil de decaimiento del 1MN aislado es monoexponencial y varía de ~7.8 ns a 5°C a ~7.2 ns a 45°C. Los complejos 1MN/HPCDs poseen un perfil biexponencial, con una componente lenta que encaja perfectamente con el tiempo de vida del 1MN aislado y otra componente más rápida, cuya contribución aumenta con la concentración de HPCD, atribuida al complejo.

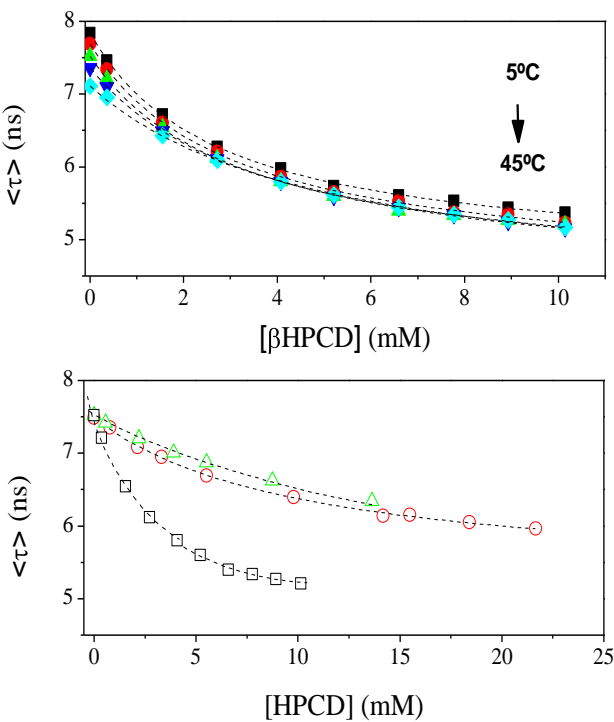


Figura 7.11. (*Superior*) Cambios en el promedio pesado del tiempo de vida $\langle \tau \rangle$ con la $[\beta\text{HPCD}]$ y la temperatura para 5 °C (■); 15 °C (●); 25 °C (▲); 35 °C (▼) y 45 °C (◆). (*Inferior*) variación del tiempo de vida medio $\langle \tau \rangle$ con $[\alpha\text{HPCD}]$ (□), $[\beta\text{HPCD}]$ (○) y $[\gamma\text{HPCD}]$ (△) a 25°C. El ajuste de las curvas a los datos experimentales se realizó aplicando la Ecuación 7.5 a partir de los valores de Φ obtenidos del estado estacionario.

Además, también analizamos la dependencia del τ con la polaridad y viscosidad del cromóforo aislado, observando que τ aumenta cuando $\epsilon > 30$, pero se mantiene prácticamente constante para $\epsilon < 30$, tal y como indica la Figura 7.10. Los resultados mostraron que para este cromóforo no hay ninguna dependencia clara de τ (ni de R) con la viscosidad. La disminución del $\langle \tau \rangle$ observada para el complejo 1MN/HPCD, respecto al cromóforo 1MN libre, o de $\langle \tau \rangle$ con la concentración de HPCDs en la Figura 7.11, se justifica de forma clara debido a la disminución en la polaridad del medio que rodea al 1MN al formarse el complejo. El 1MN pasa de un entorno acuoso con una polaridad de $\epsilon \sim 78$ al interior de una cavidad que se caracteriza por $\epsilon \sim 40-50$.

Desde el punto de vista termodinámico y a partir de la ecuación de van't Hoff se concluyó que la complejación de 1MN con α - y β HPCD tenía $\Delta H^0 < 0$ mientras que γ HPCD, muestra ΔH^0 cercano a cero, tal y como aparece en la Tabla 7.4. Al igual que con 23DMN, los complejos de 1MN con α - y β HPCDs se ven favorecidos entálpicamente, mientras que en el caso de la γ HPCD, el valor es prácticamente cero. Como indicamos anteriormente, una variación de entalpía más favorable (más negativa) está relacionada con un aumento en las interacciones de tipo van der Waals, lo que se traduce en una mejor inclusión del cromóforo en la HPCD. Estas interacciones parecen disminuir a medida que aumenta el tamaño de la cavidad.

Tabla 7.4. Valores de la entalpía y entropía obtenidos a partir de las K (Tabla 7.3).

Complejo	ΔH^0 (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^0 (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
1MN/ α HPCD	-16 ± 4	-17 ± 14
1MN/ β HPCD	-7 ± 2	$+30 \pm 7$
1MN/ γ HPCD	$+0 \pm 1$	$+42 \pm 4$

La variación de entropía es negativa cuando 1MN forma complejo con α HPCD y positiva cuando lo hace con β - y γ HPCD. La $\Delta S^0 < 0$ en el primer caso es característica de complejos donde el cromóforo se encuentra parcialmente colocado fuera de la HPCD. En el caso de la β - y γ HPCD el signo muestra que la inclusión ha sido favorable y que 1MN ha penetrado en el interior de la cavidad.

La Tabla 7.5 recoge los valores obtenidos mediante los experimentos de desactivación de la fluorescencia e indican que la accesibilidades es mucho más fácil,

obviamente, en el 1MN libre que cuando éste se encuentra complejo. La interacción de la especie desactivante con el cromóforo es ligeramente mayor cuando forma el complejo 1MN/ α HPCD, que cuando lo hace con las otras HPCDs.

Tabla 7.5. Parámetros de Stern-Volmer para 1MN y 1MN/HPCDs a 25°C.

Sistema	$\langle \tau \rangle_{q=0}$ (ns)	K_{SV} (M^{-1})	$k_q \times 10^{-9}$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
1MN	7.6	16.8 ± 0.4	2.2 ± 0.1
1MN/ α HPCD	5.7	7.0 ± 0.1	1.4 ± 0.0
1MN/ β HPCD	5.6	5.4 ± 0.1	1.2 ± 0.0
1MN/ γ HPCD	6.1	6.7 ± 0.1	1.3 ± 0.0

La variación de anisotropía (Figura 7.12) sigue la secuencia, $r_{\infty,1MN/\alpha HPCD}$ ($=0.039$) $>$ $r_{\infty,1MN/\beta HPCD}$ ($=0.034$) $>$ $r_{\infty,1MN/\gamma HPCD}$ ($=0.029$) $\gg r_{0,1MN}$. En el complejo 1MN/ α HPCD el conjunto parece comportarse como un bloque donde el cromóforo interacciona con α HPCD pero no penetra del todo dentro de la cavidad, explicando así el valor tan alto de anisotropía para este sistema. La disminución de r con el aumento en el tamaño de la HPCD podría indicar que cuanto más grande es la cavidad de la CD, mayor es la penetración del 1MN, o bien que quizás el movimiento del 1MN podría estar menos impedido cuanto mayor es la cavidad.

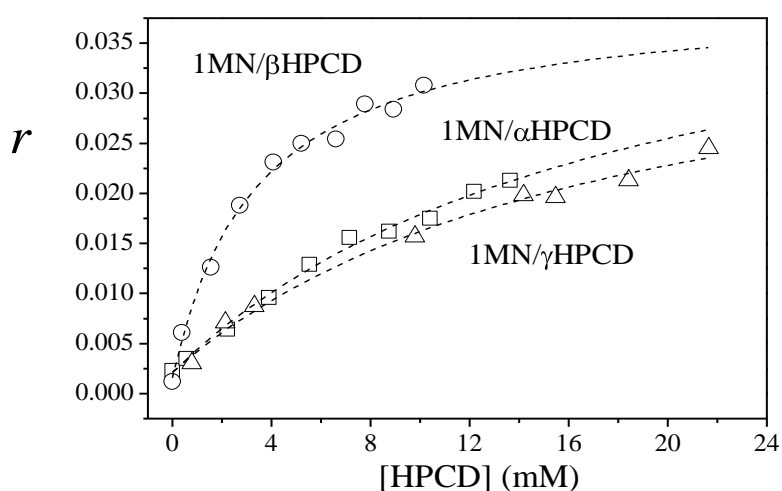


Figura 7.12. Variación de r con $[\alpha$ HPCD] (\square), $[\beta$ HPCD] (\circ), $[\gamma$ HPCD] (\triangle) a 25°C.

Para las simulaciones teóricas se siguieron los mismos procedimientos que para el 23DMN. Los análisis de MM permitieron proponer como conformaciones más estables las mostradas en la Figura 7.13. Las estructuras para el complejo del 1MN con α HPCD indican que, aunque el huésped no entra totalmente en la cavidad, cuando el eje menor del grupo naftoato se encuentra paralelo al eje principal de la ciclodextrina (2), la inclusión del 1MN es ligeramente mayor que cuando se dispone de forma perpendicular (1). Sin embargo, en el caso de los complejos con β - y γ HPCDs el cromóforo penetra totalmente en la cavidad, con la orientación del grupo naftoato más o menos perpendicular al eje del macrociclo.

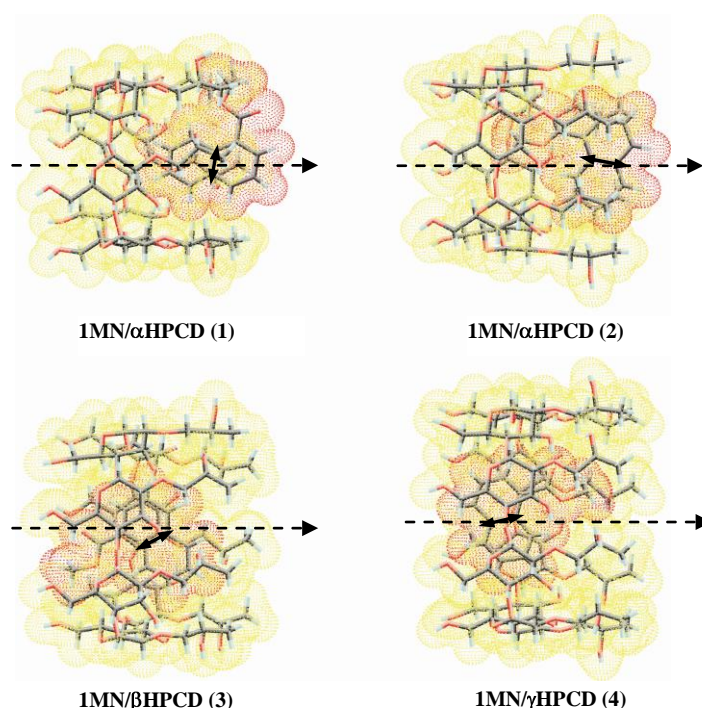


Figura 7.13. Estructuras más favorables obtenidas a partir del cálculo de MM para los complejos (1:1) de 1MN con α - (1 y 2), β - (3) y γ HPCDs (4). Flecha punteada indica la dirección del eje principal de las HPCDs. Flecha continua indica la dirección de la transición electrónica 1L_a (eje más corto del naftaleno).

Tanto el 1MN como el 23DMN van a estar, de forma parecida, incluidos parcialmente en la cavidad de α HPCD debido al reducido tamaño de ésta. En el caso de la β HPCD y γ HPCD la inclusión del 1MN va a ser completa, al igual que sucedía con el 23DMN, pero es importante advertir que la disposición de los dos huéspedes dentro de las HPCDs no es la misma. Si comparamos las Figuras 7.6 y 7.13 para el 23DMN y 1MN

vemos que las transiciones señaladas en cada figura son 1B_b y 1L_a , respectivamente, que son perpendiculares entre sí.

7.3.2 Medidas de Dicroísmo Circular

En este caso, el espectro de DC lo medimos para la banda de absorción 1L_a (que tiene un cierto solapamiento con la 1L_b) situada a 294 nm (320nm)¹³ cuyo momento de la transición está dirigido a lo largo del eje menor del naftaleno (Figura 7.14).

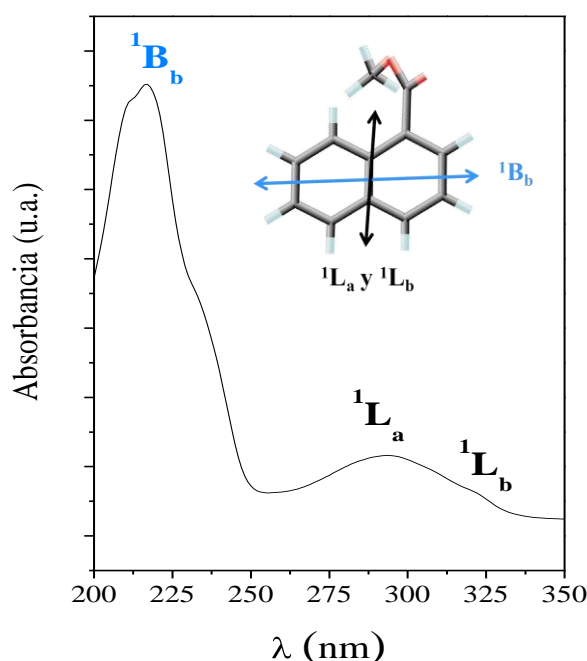


Figura 7.14. Espectro de absorción del 1MN en agua a 25°C, indicando mediante la notación Platt, la situación de cada una de las transiciones observadas. Superpuesta, la estructura del 1MN mostrando las direcciones de cada uno de los momentos electrónicos de la transición.

La Figura 7.15 corresponde a los espectros de DCI para 1MN libre y 1MN/HPCDs a 25°C. Cuando 1MN se compleja tanto con α -, como con β - y γ HPCD se obtiene, en todos los casos, una banda de signo positivo que varía en intensidad según el tipo de HPCD. La señal es mucho más intensa para la γ HPCD que para la β HPCD y sólo para el sistema con la α HPCD aparece una ligera banda positiva de poca intensidad.

La gran intensidad que alcanza la banda correspondiente al complejo 1MN/ γ HPCD sugiere una gran penetración y un buen ajuste del cromóforo, cuyo movimiento parece estar más restringido. La disminución de intensidad a medida que lo hace el tamaño de la cavidad, posiblemente estará producida por una peor inclusión del cromóforo en la

β HPCD y aún más en el caso de la α HPCD. Estos resultados estarían de acuerdo con los valores de entropía donde $\Delta S^0 < 0$ para el caso del complejo 1MN/ α HPCD indicando que la inclusión no es completa y $\Delta S^0 > 0$ para 1MN/ β HPCD y 1MN/ γ HPCD donde la penetración del cromóforo es más profunda. Además, esta misma tendencia queda respaldada por desactivación de fluorescencia, donde tanto K_{SV} como k_q indican una mayor accesibilidad del 1MN en el α HPCD que para el resto de HPCDs; y por anisotropía, donde r aumenta conforme disminuye el tamaño de la ciclodextrinas.

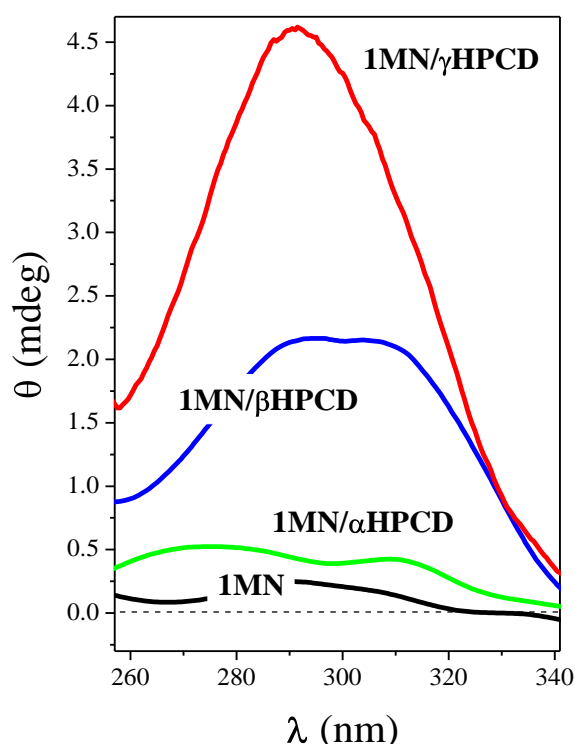


Figura 7.15. Espectro de dicroísmo circular de 1MN libre y 1MN en presencia de α -, β - y γ HPCD en agua a 25°C (preparadas con una [HPCD] para que la fracción de complejo formado en cada disolución sea 0.7) para la banda de absorción 1L_a .

Los datos experimentales también quedan apoyados por las estructuras proporcionadas por MM, donde el eje menor del grupo naftaleno (dirección del momento de la transición correspondiente a la banda 1L_a) se encuentra paralelo al eje principal de la HPCD para el caso de la 1MN/ β HPCD y 1MN/ γ HPCD, dando señales positivas de DCI. Para 1MN/ α HPCD la señal es tan baja como resultado de la disposición del cromóforo, el cual se encuentra parcialmente incluido en el interior de la cavidad. No obstante, ambas conformaciones propuestas por MM, Figura 7.13 (1) y (2), estarían de acuerdo con la

señal positiva obtenida por DCI. Aunque la transición de 1L_a se orienta de forma perpendicular en la estructura de la Figura 7.13 (1) hay que observar que el 1MN se encuentra situado mucho más hacia fuera que en la conformación (2). Esto da lugar a que las transiciones perpendiculares al eje principal de la ciclodextrina den también señales positivas, ya que como se indicó con anterioridad, cuando el cromóforo se encuentra en el exterior de la cavidad, las reglas de dicroísmo se invierten.

La elección de la banda en el análisis en DCI no se da de forma arbitraria. Si para el estudio de 23DMN se escogía la banda 1B_b y ahora para el 1MN es la 1L_a , es debido a que dichas transiciones dan la señal más intensa en el espectro de DCI en cada uno de los casos. Como se explicó anteriormente, las disposiciones más intensas son aquellas cuyo momento de la transición del cromóforo es paralelo al eje principal de la ciclodextrina. La orientación del 23DMN en el interior de la cavidad de HPCD es perpendicular a la disposición que adquiere el 1MN y, por tanto, las bandas de mayor intensidad de DCI en cada uno de los sistemas no van a ser las mismas. En el caso de 23DMN, es la transición 1B_b la que posee el momento de la transición electrónica paralelo al eje principal del macrociclo, mientras que para el 1MN la que tiene esa orientación es la 1L_a .

7.4 Conclusiones

Mediante la técnica de DC se han podido explicar de forma sencilla la estructura de diferentes complejos de inclusión de dos moléculas huésped derivados del naftaleno con HPCDs. Los resultados no solamente han respaldado los datos experimentales obtenidos por fluorescencia, sino también han coincidido de forma muy precisa con las predicciones teóricas. Estos experimentos demuestran la gran validez de esta técnica para el estudio estructural de sistemas huésped/anfitrión con CD.

7.5 Referencias

- (1) Mendicuti, F.; González-Álvarez, M. J. *J. Chem. Educ.* **2010**, 87, 965.
- (2) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **2002**, 56, 1579.
- (3) Di Marino, A.; Rubio, L.; Mendicuti, F. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, 58, 103.
- (4) Alvariza, C.; Usero, R.; Mendicuti, F. *Spectrochim. Acta, Part A* **2007**, 67, 420.
- (5) Mendicuti, F. *Trends Phys. Chem.* **2006**, 11, 61.

- (6) Madrid, J. M.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2037.
- (7) Cervero, M.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1572.
- (8) Pastor, I.; Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Photochem. Photobiol., A* **2005**, *173*, 238.
- (9) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *58*, 295.
- (10) Usero, R.; Alvariza, C.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 1103.
- (11) González-Álvarez, M. J.; Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 449.
- (12) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875.
- (13) Platt, J. R. *J. Chem. Phys.* **1949**, *17*, 484.
- (14) Kodaka, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 8101.
- (15) Yorozu, T.; Hoshino, M.; Imamura, M. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 4426.
- (16) Loukas, Y. L. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 4863.

**Estudio de la Dimerización y
Heteroasociación de Ciclodextrinas
Modificadas con Xilileno**

8.1 Introducción

Las ciclodextrinas modificadas con grupos cromóforos han sido ampliamente estudiadas debido a su potencial capacidad de actuar como sensores químicos¹⁻⁵ y antenas moleculares.^{6,7} La sustitución del cromóforo puede realizarse en la cara primaria o secundaria, aunque la mayoría de las ciclodextrinas modificadas encontradas en la bibliografía⁸⁻¹⁰ están sustituidas en posiciones primarias, debido al hecho de que son más fáciles de sintetizar. Es importante destacar que sus propiedades van a depender en gran medida de la localización de ese cromóforo, siendo muy diferentes las propiedades de la ciclodextrina si la sustitución se produce en la cara primaria o secundaria.¹¹

Dentro de las ciclodextrinas sustituidas en la cara primaria cabe destacar la investigación realizada por el grupo de A. Harada,^{8,12-15} que ha estudiado las propiedades conformacionales de ciclodextrinas modificadas con grupos cinamoil e hidrocinamoil en disolución acuosa mediante técnicas de 2D RMN. Los resultados mostraron que mientras que la 6-*O*-hidrocinamoil- β -ciclodextrina formaba complejos intramoleculares, donde cada grupo 6-hidrocinamoil se introducía dentro de su propia cavidad, la -*O*-hidrocinamoil- α -ciclodextrina era capaz de formar complejos intermoleculares débiles. El grupo de T. Kaneda^{9,10} ha analizado procesos de asociación intermolecular de la α -ciclodextrina permitilada sustituida con azobenceno y el de A. Kaifer¹⁶ la β CD modificada con grupos viológenos, en los dos casos los sustituyentes se encuentran situados en la cara primaria. Y. Inoue^{17,18} y sus colaboradores han publicado la formación de estructuras diméricas intermoleculares de tipo cabeza-cabeza (HH) y cabeza-cola (HT) para las *p*-nitrobenzoil y *p*-hidroxibenzoil- β CDs. De forma análoga, Y. Liu¹⁹ y col. han descrito la formación de dímeros tipo cabeza-cola (HT) en disolución acuosa del 6-*O*-(4-formilfenil)- β CD, como proceso previo a la formación de estructuras más complejas como son los sistemas supramoleculares lineales a modo de polímero. Otro ejemplo de agregación de mayor tamaño lo describe el grupo de K. Yannakopoulou,²⁰ el cual ha publicado la síntesis y el estudio, tanto en disolución como en estado sólido, de β CDs modificadas con *o*-, *m*-, *p*-ácido aminobenzoico. En estos sistemas se observa que en disolución ninguno de ellos presenta inclusión ya fuera de tipo inter- o intramolecular, simplemente el cromóforo gira y se coloca de forma paralela a la cavidad primaria de tal forma que solo interacciona con los H de esta cara. Por el contrario, en estado sólido se observa que el *p*-aminobenceno- β CD forma inclusión por la cara secundaria con otra

ciclodextrina diferente, formando una cadena de polímero con unidades monoméricas no covalentemente enlazadas. Según J.W. Park, las propiedades de las ciclodextrinas modificadas van a depender de las características de los conectores que unen el fluoróforo con la ciclodextrina: conectores flexibles entre el grupo y la ciclodextrina favorecen los procesos de autoinclusión, mientras que conectores cortos y rígidos benefician los procesos de asociación intermolecular. Ejemplos de este último caso son la β CD modificada con naftaleno²¹ y α CD modificada con azobenzeno.²² En ambos sistemas se forman dímeros del tipo cabeza-cabeza (HH) con los sustituyentes parcialmente incluidos en la cavidad de la CD vecina, donde se establecen interacciones mutuas favorables.

Ejemplos de este tipo de estudios sobre ciclodextrinas que contienen grupos cromóforos sustituidos en la cara secundaria son muy escasos. Además, debido a la alta rigidez de las posiciones secundarias, los procesos de autoinclusión van a ser mucho menos favorables. J.W. Park²³ y col. realizaron un estudio comparativo entre β -CDs modificadas con derivados de viológeno unidos a la cara primaria o secundaria, y explicaron que cada tipo de ciclodextrina mostraba un comportamiento totalmente diferente. El grupo que tenía el sustituyente en posición primaria daba procesos de autoinclusión, mientras que aquellas β CDs modificadas en la cara secundaria mostraban procesos de asociación intermolecular, produciendo dímeros de tipo cabeza-cabeza (HH). El grupo de A. Harada²⁴ también ha sintetizado derivados de estilbeno con α CD en la cara secundaria. A través de la fotoirradiación se controla la isomerización *cis*↔*trans* del estilbeno y se observa que el *trans*-estilbeno- α CD produce asociaciones de tipo dímero, mientras que el isómero *cis* formaba un ensamblado supramolecular donde los sustituyentes no están total o parcialmente incluidos en las ciclodextrinas, sino que se colocan en el exterior mediante interacciones de empaquetamiento π - π dando lugar a una estructura tipo hélice.

Una familia muy particular de ciclodextrinas modificadas son aquellas donde el sustituyente está unido a dos posiciones. Dentro de este grupo podemos encontrar dos tipos de CDs. Por una parte, las que se denominan *ciclodextrinas de doble cavidad*, donde el sustituyente forma un puente entre dos unidades de ciclodextrina.²⁵ Por otra, aquellas donde el sustituyente está unido a dos posiciones pero dentro de la misma ciclodextrina, preferentemente en la misma unidad de glucopiranososa, llamadas *ciclodextrinas tapadera*.²⁶ En este caso la movilidad del sustituyente se encuentra muy restringida, lo que tiene como ventaja aumentar su capacidad para discriminar entre diferentes

moléculas huésped en procesos de inclusión. En los ejemplos descritos en la bibliografía sobre ciclodextrinas con grupos cromóforo que actúan a modo de tapadera de la cavidad, éstos se encuentran sustituidos en la cara primaria.

Los grupos de la Prof.^a Carmen Ortiz Mellet y del Prof. José Manuel García Fernández han sintetizado por primera vez ciclodextrinas sustituidas con un grupo cromóforo que actúa como tapadera y que se encuentra unido a las posiciones 2 y 3 (cara secundaria) de la misma unidad de glucopiranososa, a modo de bisagra bidentada.²⁷ En concreto, las primeras de estas ciclodextrinas sintetizadas son los derivados permetilados de las α -, β - y γ CDs donde el grupo cromóforo xilileno se encuentra enlazado a la CD en esas posiciones.

Estas CDs pueden ser potencialmente útiles como discriminadoras de moléculas huésped y modificar sensiblemente la termodinámica de complejación de las mismas. Pero además, estudios preliminares por ^1H RMN sobre una de ellas, la 2^I,3^I-O-(*o*-xilileno)-per-O-Me- β -CD en agua deuterada mostraron un equilibrio conformacional, en el que el grupo xilileno estaba implicado, que dependía fuertemente de la temperatura. En este equilibrio, el grupo xilileno presenta dos disposiciones: en una de ellas éste parece bloquear la cavidad de la cara secundaria (denominada conformación *tapadera*) y en la otra, el cromóforo se encuentra algo más alejado de la misma (*abierta*). El proceso de autoinclusión parece no darse en esta clase de ciclodextrinas, pero comparando los espectros de RMN a varias temperaturas y concentraciones, también se observa la presencia de fenómenos de autoagregación en forma de dímeros. Ambos procesos, equilibrio y autoagregación, deberían influir y competir con la propia complejación.²⁷

Por este motivo realizamos el estudio sobre la termodinámica de la homo- y heterodimerización, la simulación de los procesos de complejación y dimerización y el estudio del comportamiento conformacional en disolución acuosa de las 2^I,3^I-O-(*o*-xilileno)-per-O-Me- α -, β - y γ -CDs ($Xm\alpha\text{CD}$, $Xm\beta\text{CD}$ y $Xm\gamma\text{CD}$, respectivamente) que se describe en este capítulo. Para ello se emplearon técnicas de fluorescencia, Mecánica Molecular (MM) y Dinámica Molecular (DM). El promedio de tiempo de vida de fluorescencia, $\langle\tau\rangle$, es una propiedad muy sensible al proceso de asociación, a partir del cual pudimos obtener las constantes de dimerización, K_D . Con estos resultados y mediante la ecuación de van't Hoff, también se dedujeron los parámetros termodinámicos ΔH^0 y ΔS^0 . Los cálculos por MM y DM se utilizaron para analizar el comportamiento

conformacional de las CDs monoméricas aisladas, la estructura de los dímeros formados y las fuerzas responsables del proceso de dimerización.^{28,29}

Constantes de dimerización (ver Anexo I para el desarrollo completo)

Para el proceso de dimerización dado por el equilibrio:



la constante de dimerización K_D viene expresado como:

$$K_D = \frac{[(XmCD)_2]}{[XmCD]^2} \quad 8.2$$

Las concentraciones de monómero y dímero en función de la concentración inicial de CD, $[CD]_0$, en el equilibrio se pueden obtener como:

$$[(XmCD)_2] = \frac{(4K_D[XmCD]_0 + 1) - \sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1}}{8K_D} \quad 8.3$$

y

$$[XmCD] = \frac{\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1}{4K_D} \quad 8.4$$

Por otra parte, la intensidad de fluorescencia observada en una disolución de $XmCD$ puede describirse como la suma de las contribuciones debidas a la fluorescencia del monómero y del dímero:

$$\begin{aligned} I &= I_{XmCD} + I_{(XmCD)_2} = \phi_{XmCD}[XmCD] + 2\phi_{(XmCD)_2}[(XmCD)_2] = \\ &= \phi_{XmCD}[XmCD] + 2\phi_{(XmCD)_2}K_D[XmCD]^2 \end{aligned} \quad 8.5$$

donde ϕ_{XmCD} y $\phi_{(XmCD)_2}$ son constantes de proporcionalidad que relacionan la intensidad de fluorescencia (por unidad de cromóforo) con la concentración de $XmCD$ libre y

$(XmCD)_2$. Estos parámetros dependen de las condiciones instrumentales, el rendimiento cuántico y la absorptividad molar a la longitud de onda de excitación.

Reorganizando la Ecuación 8.5 y sustituyendo en ella las Ecuación 8.4 y 8.3, se obtiene la Ecuación 8.6 que relaciona la intensidad de emisión de fluorescencia y la concentración inicial de ciclodextrina $[XmCD]_0$, tal como:

$$I = \phi_{(XmCD)_2} \frac{(4K_D[XmCD]_0 + 1) - \sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1}}{4K_D} + \phi_{XmCD} \frac{(\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)}{4K_D} \quad 8.6$$

que puede ser reescrita como:

$$I = \phi_{(XmCD)_2} [XmCD]_0 - (\phi_{(XmCD)_2} - \phi_{XmCD}) \frac{(\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)}{4K_D} \quad 8.7$$

De forma análoga, se puede relacionar el promedio de tiempo de vida $\langle \tau \rangle$ con la $[XmCD]_0$ mediante:

$$\langle \tau \rangle = \frac{2\tau_{XmCD} + (\phi_{(XmCD)_2} / \phi_{XmCD}) \tau_{(XmCD)_2} (\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)}{2 + (\phi_{(XmCD)_2} / \phi_{XmCD}) (\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)} \quad 8.8$$

donde τ_{XmCD} y $\tau_{(XmCD)_2}$ son los tiempos de vida de la especie libre y del dímero, respectivamente.

8.2 Resultados y discusión

Espectros de absorción

El espectro de absorción del cromóforo xilileno aislado (oXy) en agua presenta tres bandas estrechas cuyos máximos están situados aproximadamente a 260, 264 y 270 nm (Figura 8.1, superpuesta). Las tres $XmCD$ s muestran el mismo espectro de absorción pero ligeramente desplazado hacia el azul en torno a 2 nm. Además, a medida que aumenta la concentración de las $XmCD$ s, aparece una nueva banda a 288 nm, que es considerablemente intensa a altas concentraciones.

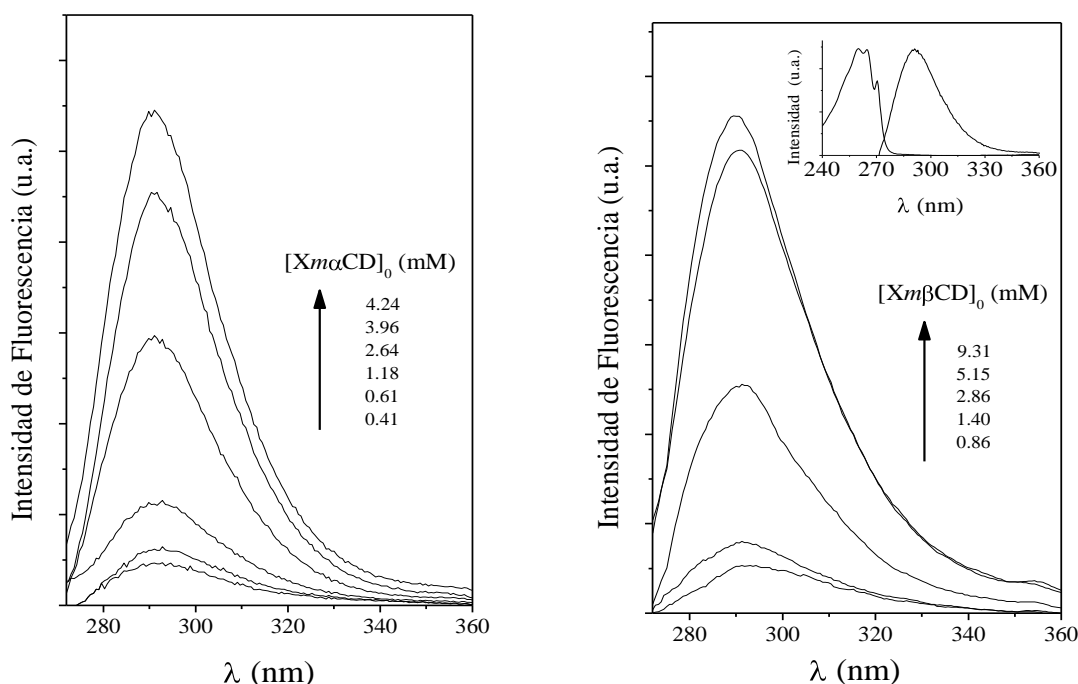


Figura 8.1. Espectro de emisión a diferentes concentraciones de $Xm\alpha$ CD (izquierda) y $Xm\beta$ CD (derecha) en agua a 25°C. Superpuesto se encuentra el espectro de absorción y emisión de oXy en agua a 25°C.

Espectros de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión fueron obtenidos excitando el grupo cromóforo xilileno (Xy) a 260 nm. Para los tres tipos de ciclodextrinas y a cualquier temperatura, solo muestran una banda centrada a 288 nm (Figura 8.1). Si se aumenta la concentración de Xm CD, la intensidad de fluorescencia aumenta, aunque este incremento va a variar según el tipo de Xm CD empleada y temperatura del experimento. Como es de esperar, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la fluorescencia para cualquiera de los tres tipos de Xm CDs. Todas las representaciones de la intensidad de fluorescencia, que fueron corregidas teniendo en cuenta el efecto interno según la Ecuación 6.1 (Capítulo 6), frente a la concentración de Xm CD (o absorbancia) dan ajustes lineales en todo el intervalo de concentraciones empleado. Según la Ecuación 8.7, esto se traduce en que $\phi_{XmCD} \approx \phi_{(XmCD)_2}$, es decir, que el rendimiento cuántico de fluorescencia de las Xm CDs no varía al pasar de la forma monomérica a la dimérica (Figura 8.2). De aquí se deduce que la intensidad de fluorescencia no es sensible a la formación de dímeros y que, por tanto, no se puede emplear como parámetro para obtener las constantes de asociación. Para ninguna de las tres Xm CDs se observó un ensanchamiento de la banda de emisión hacia el rojo, siendo esto indicativo de la ausencia de excímeros.

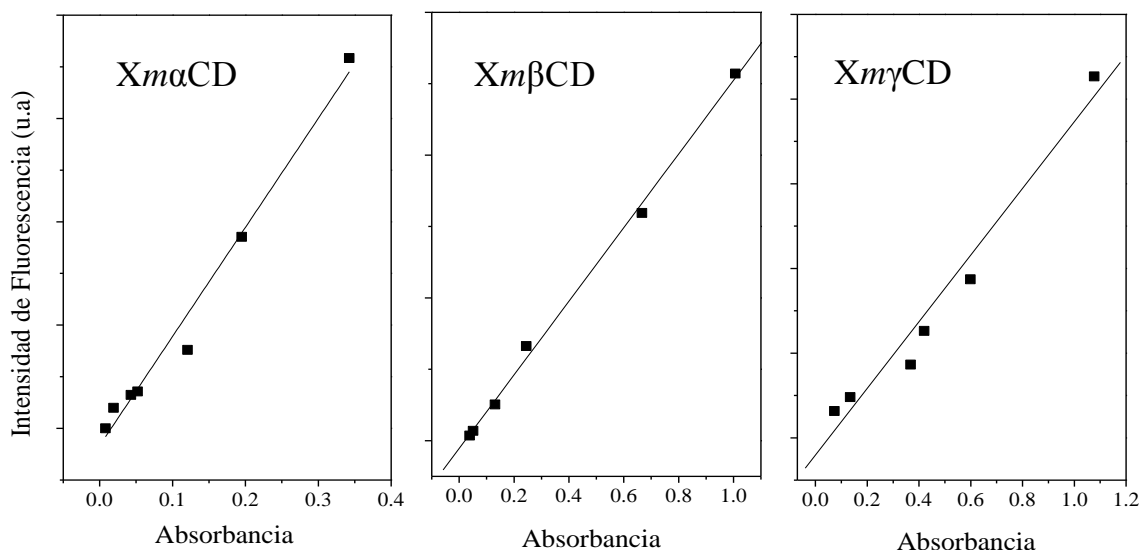


Figura 8.2. Variación de la intensidad de emisión corregida, frente a la absorbancia a diferentes concentraciones de $Xm\alpha CD$ (izquierda), $Xm\beta CD$ (centro) y $Xm\gamma CD$ (derecha) en agua a 25°C.

Decaimiento de tiempo de vida de fluorescencia

Las medidas de decaimiento de tiempo de vida a las diferentes concentraciones y temperaturas fueron realizadas recogiendo en el máximo de la banda de emisión del grupo Xy (288 nm) y excitando a 260 nm.

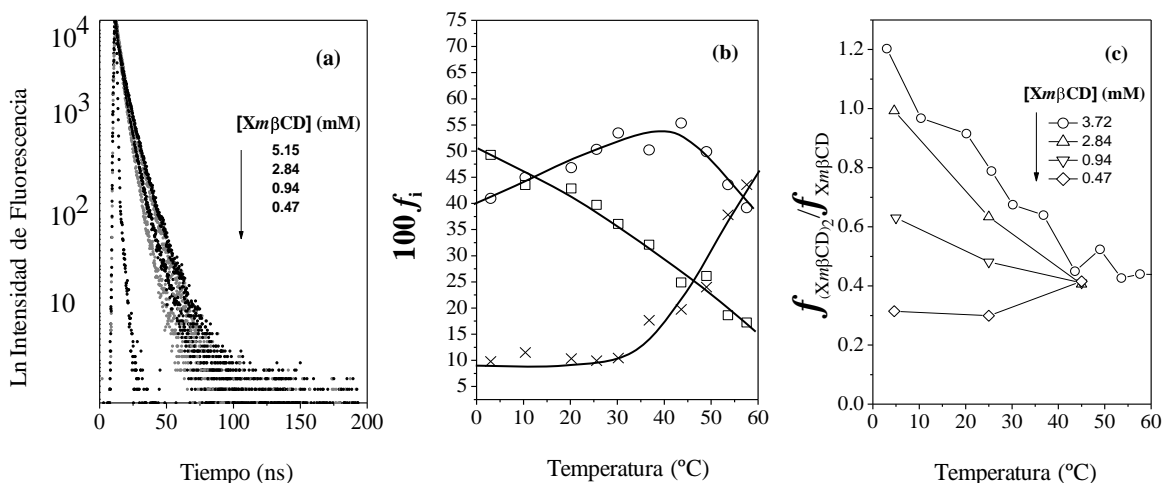


Figura 8.3. a) Decaimiento de fluorescencia para varias disoluciones de $Xm\beta CD$ /agua a 25°C. b) Cambios con la temperatura de las fracciones ($100 \times f_i$) de las diferentes contribuciones asociadas a: monómero (○), dímero (□) y dispersión de luz (×) para una disolución de $[Xm\beta CD] = 3.724$ mM. c) Variación en la relación dímero/monómero con la $[Xm\beta CD]$ y la temperatura.

En la Figura 8.3 (a) se muestran los decaimientos para algunas concentraciones de $Xm\beta CD$. Todos los perfiles de decaimiento de fluorescencia para los tres tipos de $XmCD$, fueron ajustados a la suma de tres exponenciales, correspondientes a tres componentes diferentes, cada una de ellas caracterizada por un tiempo de vida:

a) Una de tiempo de vida corto, aproximadamente entre 0.05-0.3 ns, cuya contribución aumenta con la temperatura y disminuye con la concentración (Figura 8.3.b). Esta componente rápida se puede atribuir a la dispersión de luz (*scattering*) de la muestra y/o del disolvente y es importante tenerla en cuenta sobre todo a las concentraciones más bajas y/o a las temperaturas más altas (cuando la fluorescencia está más desactivada térmicamente). Este fenómeno es debido a que el cromóforo Xy posee una baja eficiencia cuántica y que además las cubetas cilíndricas empleadas muestran una cierta señal umbral innata debido a posibles reflexiones en la superficie (*stray light*).

b) Una componente de tiempo de vida intermedio, aproximadamente entre 3-6 ns, cuyo valor es parecido para los tres tipos de $XmCD$ s. Su contribución aumenta con la temperatura y disminuye con la concentración, como se indica en las Figura 8.3.b y 8.3.c. Esta componente está relacionada con la especie no asociada o monómero $XmCD$.

c) Una de tiempo de vida largo, que puede ser atribuida al dímero $(XmCD)_2$, con un valor entre 6-20 ns. Su contribución aumenta con la concentración y disminuye con la temperatura. Esta tendencia con la temperatura estaría de acuerdo con el hecho de que la dimerización se trataría de un proceso favorecido entálpicamente, tal y como muestra la Figuras 8.3.b y 8.3.c.

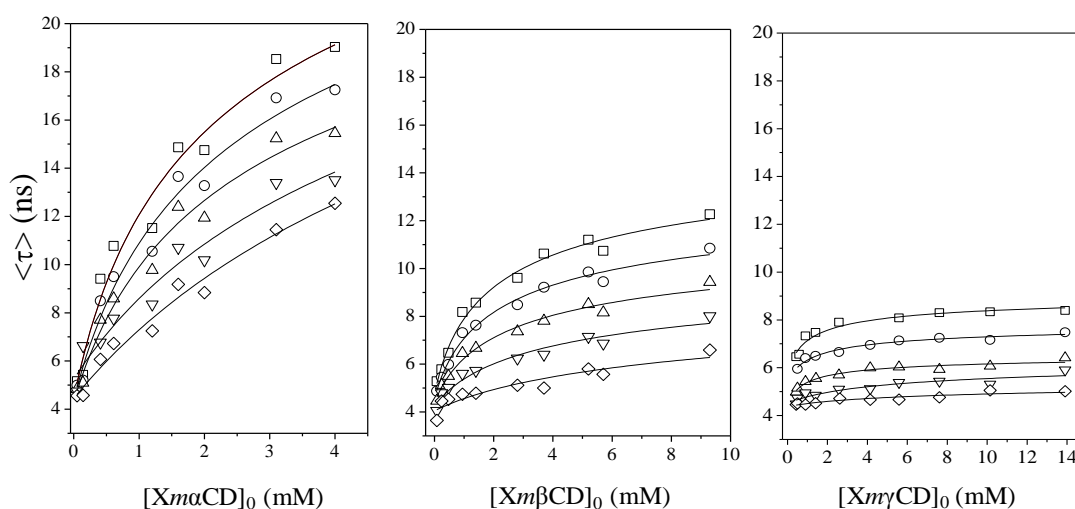


Figura 8.4. Variación del promedio de tiempo de vida $\langle \tau \rangle$ en función de la concentración para $XmaCD$ /agua (izquierda), $Xm\beta CD$ /agua (centro) y $XmyCD$ /agua (derecha) a diferentes temperaturas 5 °C (\square); 15 °C (\circ); 25 °C (\triangle); 35 °C (∇) y 45 °C (\diamond).

La Figura 8.4 muestra la variación de los promedios de tiempos de vida ($\langle\tau\rangle$), obtenida según la Ecuación 7.4 (Capítulo 7), en función de la $[XmCD]$ para los diferentes tipos de $XmCD$ s y temperaturas. Las líneas continuas muestran el ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 8.8. Para el cálculo de $\langle\tau\rangle$ no se tuvo en cuenta la componente rápida debida a la dispersión de luz. Además en el ajuste, se ha asumido que $\phi_{XmCD} \approx \phi_{(XmCD)_2}$, tomando en la Ecuación 8.8 $\phi_{(XmCD)_2} / \phi_{XmCD} = 1$.

El $\langle\tau\rangle$ aumenta con la concentración de $XmCD$ como consecuencia de la dimerización, ya que, el tiempo de vida del dímero es mayor que el del monómero, y su contribución al promedio de tiempo de vida aumenta conforme aumenta la concentración. La magnitud del incremento depende del tipo de CD, siendo mayor para $Xm\alpha CD$, que para $Xm\beta CD$ y que $Xm\gamma CD$ (ver Figura 8.5). Una mayor variación no se traduce en mayores constantes, sino todo lo contrario. De hecho, como veremos K_D sigue el orden inverso, siendo $K_{D,Xm\gamma CD} > K_{D,Xm\beta CD} > K_{D,Xm\alpha CD}$ (ver Tabla 8.1).

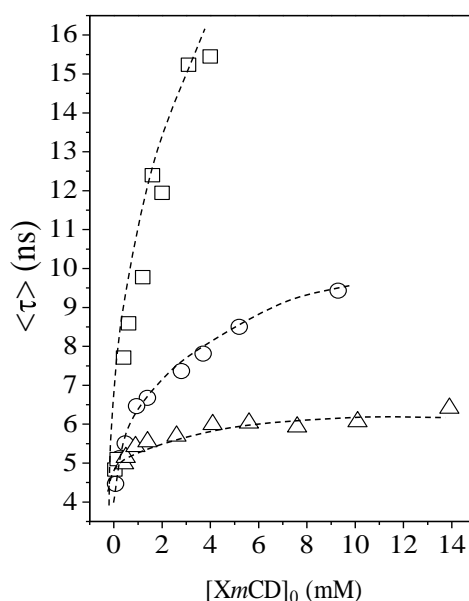


Figura 8.5. $\langle\tau\rangle$ vs $[XmCD]$ para disoluciones acuosas de $Xm\alpha CD$ (\square), $Xm\beta CD$ (\circ) $Xm\gamma CD$ (\triangle) a 25°C.

Dependencia del rendimiento cuántico y del tiempo de vida con la polaridad del medio (ϵ) y la microviscosidad (η)

Para entender mejor los cambios de intensidad de fluorescencia y de $\langle\tau\rangle$ durante la dimerización, hemos estudiado el comportamiento en disolución del cromóforo xilileno aislado (oXy). Para ello, analizamos las variaciones que experimentan el rendimiento

cuántico (ϕ) y el tiempo de vida (τ) del compuesto modelo oXy con la polaridad (ϵ) y la microviscosidad (η) del medio. El procedimiento consistió en obtener los espectros de emisión y perfiles de decaimiento de fluorescencia en diferentes disolventes (agua y n-alcoholes, desde metanol hasta heptanol) de manera que cubriesen el mayor rango posible de polaridades, ϵ y viscosidades, η .

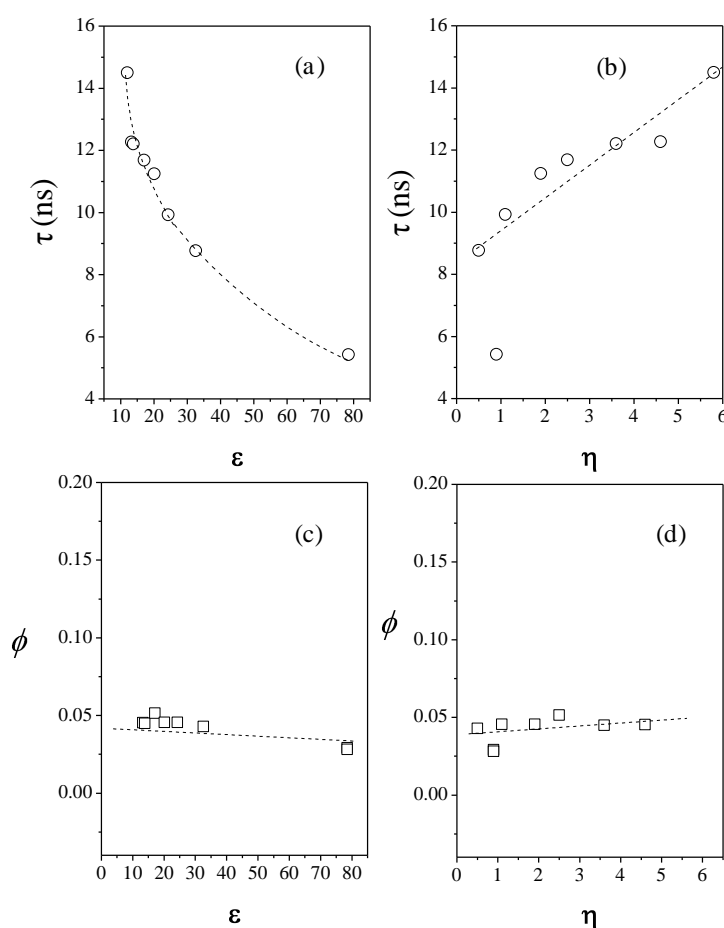


Figura 8.6. Variación del rendimiento cuántico (ϕ) y el tiempos de vida (τ) con la polaridad (ϵ) y microviscosidad (η) para oXy en agua y diferentes disolventes n-alcoholes (desde metanol a heptanol) a 25°C.

Todos los espectros de emisión mostraron la banda característica del oXy y que el decaimiento de fluorescencia era monoexponencial para cualquiera de los disolventes empleados. En la Figura 8.6, se representan la variaciones de ϕ y τ con ϵ y η . Los resultados muestran un aumento de τ con la polaridad del medio y con la viscosidad, mientras que ϕ prácticamente no depende de estas propiedades. La formación del dímero debería implicar una disminución en la polaridad y un aumento en la microviscosidad del

medio que rodea el grupo Xy. Los resultados obtenidos estarían totalmente de acuerdo con el hecho de que las eficiencias cuánticas del dímero y del monómero sean parecidas, $\phi_{XmCD} \approx \phi_{(XmCD)_2}$ y que $\langle \tau \rangle$ aumente con la $[XmCD]$ debido a que $\tau_{(XmCD)_2} > \tau_{XmCD}$. De hecho, la mayor o menor variación en esta última propiedad según el tipo de $XmCD$, se puede relacionar con la polaridad y la microviscosidad del entorno alrededor del Xy. Ya que $\tau_{(XmaCD)_2} > \tau_{(Xm\beta CD)_2} > \tau_{(Xm\gamma CD)_2}$, se puede deducir que se produce un aumento en la polaridad y una disminución de la microviscosidad con el tamaño de la $XmCD$, hipótesis bastante razonable. Estudios de complejación de CDs con 2-metilnaftoato, sonda fluorescente sensible a la polaridad del medio donde se encuentra, revelaron que la polaridad en el interior de las CDs naturales aumenta considerablemente a medida que aumenta el tamaño de la cavidad.³⁰

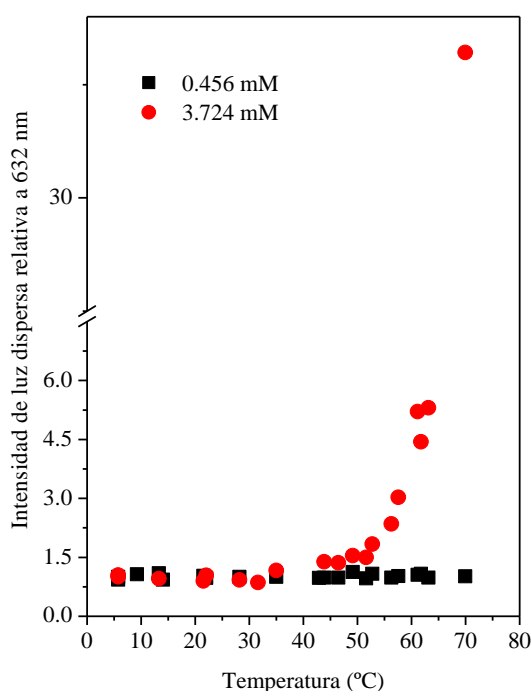


Figura 8.7. Medidas de dispersión de luz estática (a 632 nm) realizadas para dos disoluciones de $Xm\beta CD$ a varias temperaturas.

Como indicamos anteriormente, la baja eficiencia cuántica del cromóforo Xy ($\phi_{oXy/agua}=0.029$ a $25^\circ C$) y el uso de cubetas cilíndricas de pequeño paso, hacen que la componente asociada a la dispersión de luz sea importante, sobre todo a las concentraciones más bajas y/o a las temperaturas más altas. La principal razón de esta

contribución tan alta es la baja solubilidad de la muestra, especialmente a las temperaturas más altas. Una característica de las $XmCDs$, que además comparten con las ciclodextrinas metiladas,³¹ es que el coeficiente de solubilidad en agua es negativo, es decir, su solubilidad disminuye con la temperatura. Muchas investigaciones³²⁻³⁴ apuntan a que esta disminución de la solubilidad con la temperatura es debida a las moléculas de agua de hidratación que se disponen alrededor de los grupos metilos. Al aumentar la temperatura, este ordenamiento se rompe favoreciendo la asociación de las ciclodextrinas mediante efecto hidrofóbico. Medidas de dispersión de luz estática (a 632 nm) realizadas para disoluciones de $XmCDs$ en agua a diferentes temperaturas y concentraciones, apoyan estos resultados obtenidos por decaimiento de fluorescencia. La Figura 8.7 muestra la dispersión Rayleigh para dos disoluciones de diferente concentración de $Xm\beta CD$.

Termodinámica del proceso de dimerización

Mediante el ajuste de la Ecuación 8.8 a los datos experimentales del promedio de tiempo de vida ($\langle\tau\rangle$) en función de la concentración de $XmCD$ a cada temperatura, se obtuvieron las constantes de dimerización (K_D), $\tau_{(XmCD)_2}$ y τ_{XmCD} , recogidos en la Tabla 8.1.

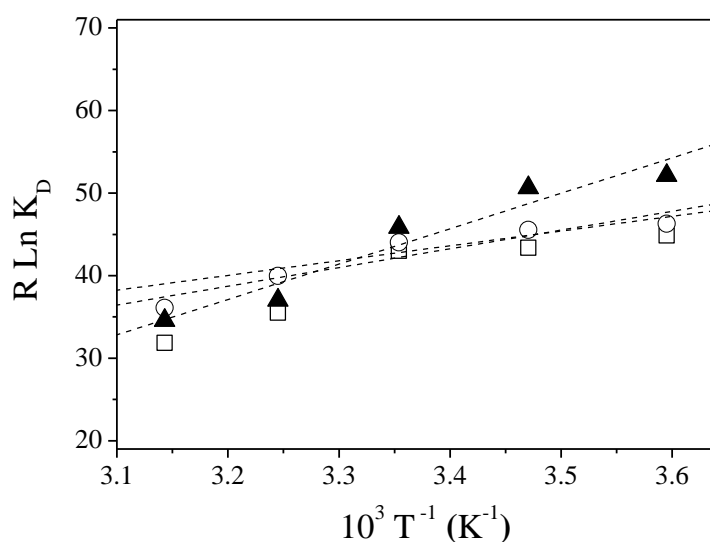


Figura 8.8. Representaciones de van't Hoff obtenidas mediante las K_D recogidas en la Tabla 8.1 para $Xm\alpha CD$ (□), $Xm\beta CD$ (○) y $Xm\gamma CD$ (▲).

A partir de las K_D , se dedujeron los valores de los parámetros termodinámicos ΔH^0 y ΔS^0 mediante la representación lineal de van't Hoff, tal y como muestra la Figura 8.8.

Los parámetros termodinámicos para cada una de las $XmCDs$ están recogidos en la Tabla 8.2. Las gráficas son razonablemente lineales, teniendo en cuenta los errores que acompañan a los valores de K_D . No obstante, la pequeña curvatura hacia abajo observada estaría de acuerdo con ΔC_p^0 negativas para los tres tipos de $XmCD$. $\Delta C_p^0 < 0$ son típicas de moléculas apolares que se encuentran inicialmente en un medio acuoso y pasan a medios más hidrofóbicos, como puede ser el interior o el entorno de la cavidad de las CDs,³⁵⁻³⁸ lo que respaldaría el proceso de dimerización.

Tabla 8.1. Constantes de asociación K_D , τ_{XmCD} y $\tau_{(XmCD)_2}$ obtenidos mediante el análisis de decaimiento de tiempos de vida a diferentes $[XmCD]_0$ y temperaturas.

$Xm\alpha CD$

T(°C)	$K_D(M^{-1})$	τ_{XmCD} (ns)	$\tau_{(XmCD)_2}$ (ns)
5	221 ± 109	4.4 ± 0.9	35 ± 6
15	184 ± 88	4.4 ± 0.7	34 ± 6
25	177 ± 80	4.3 ± 0.6	30 ± 5
35	72 ± 55	5.2 ± 0.6	35 ± 14
45	46 ± 30	4.5 ± 0.3	41 ± 15

$Xm\beta CD$

T(°C)	$K_D(M^{-1})$	τ_{XmCD} (ns)	$\tau_{(XmCD)_2}$ (ns)
5	262 ± 80	4.8 ± 0.3	16.2 ± 0.9
15	239 ± 74	4.6 ± 0.3	14.2 ± 0.8
25	200 ± 74	4.4 ± 0.2	12.3 ± 0.9
35	122 ± 72	4.3 ± 0.2	10.9 ± 13.7
45	77 ± 60	4.3 ± 0.3	9.0 ± 2.4

$Xm\gamma CD$

T(°C)	$K_D(M^{-1})$	τ_{XmCD} (ns)	$\tau_{(XmCD)_2}$ (ns)
5	529 ± 135	5.8 ± 1.0	9.3 ± 0.5
15	442 ± 87	5.3 ± 0.5	8.1 ± 0.3
25	248 ± 75	4.8 ± 0.3	7.0 ± 0.4
35	86 ± 50	4.5 ± 0.2	7.1 ± 0.8
45	64 ± 83	4.3 ± 0.1	5.6 ± 0.6

La asociación está favorecida entálpicamente para las tres $XmCDs$ y aunque ΔH^0 es muy similar en $Xm\alpha CD$ y $Xm\beta CD$, para $Xm\gamma CD$ la variación de entalpía es mucho más negativa. Como indicamos anteriormente, valores de $\Delta H^0 < 0$ se asocian a interacciones intermoleculares del tipo van der Waals o puentes de hidrógeno.³⁶

En cuanto al valor y el signo del ΔS^0 durante el proceso de dimerización es el resultado del balance de dos efectos contrapuestos:

- La pérdida de grados de libertad que acompaña a cualquier asociación y contribuye de forma desfavorable, disminuyendo la entropía.
- La ruptura del ordenamiento de agua de hidratación que se forma alrededor de las CDs y en el interior de la cavidad, que contribuye a aumentar la entropía.

Durante la asociación de las $XmCDs$, no parece compensarse el primer efecto, siendo la dimerización, por tanto, un proceso entrópicamente desfavorable. Cabe destacar que una molécula huésped que penetra totalmente en la cavidad de la ciclodextrina presenta $\Delta S^0 > 0$.^{36,39} Este hecho podría sugerir que el ligando Xy no debe encontrarse totalmente incluido para ningún tipo de las $XmCDs$.

Tabla 8.2. ΔH^0 y ΔS^0 del proceso de dimerización para sistemas $XmCD$ /agua

Sistema	ΔH^0 (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^0 (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
$Xm\alpha CD$	-30 ± 7	-60 ± 23
$Xm\beta CD$	-23 ± 4	-34 ± 15
$Xm\gamma CD$	-100 ± 22	-43 ± 7

No se han encontrado referencias bibliográficas donde se describan parámetros termodinámicos del proceso de dimerización de CDs, aunque los signos y las magnitudes de los mismos están de acuerdo con complejos huésped-anfitrión con estequiometrías mayores que 1:1 o para asociaciones más complejas formadas por varias moléculas de huésped y CDs.^{35,40}

Polarización de fluorescencia

La anisotropía (r) de un cromóforo en un disolvente concreto está relacionada con la difusión rotacional de dicho cromóforo en ese medio. La agregación o complejación son fenómenos que implican valores altos de anisotropía, debidos a la relativa baja difusión rotacional de estos sistemas si los comparamos con las moléculas libres. Los

resultados obtenidos muestran un incremento de r con la concentración, pero también con la temperatura. El primero de estos datos estaría de acuerdo con el incremento en la formación de dímeros $(XmCD)_2$, que tiene una difusión rotacional menor que la especie monomérica, $XmCD$. Sin embargo, al tratarse la dimerización de un proceso entálpicamente favorecido, debería disminuir la fracción de dímero conforme aumenta la temperatura, y por consiguiente, r también debería descender. Existe un factor que no hemos tenido en cuenta, el *scattering* o luz dispersa que se encuentra 100% polarizado y contribuye a aumentar los valores de anisotropía. Todo ello hace que cualquier conclusión deducida del análisis de los datos de anisotropía no sea demasiado fiable. De hecho, la disminución de la solubilidad de las $XmCD$ s con la temperatura y consecuente aumento de la luz dispersada, es probablemente el causante de ese aumento en la anisotropía.

Desactivación de fluorescencia

Los sistemas oXy y $XmCD$ en disolución acuosa fueron también estudiados mediante desactivación de fluorescencia a varias temperaturas, empleando como desactivador la 2,3-butanodiona (diacetilo). Este compuesto orgánico ha sido utilizado anteriormente en estudios de complejación de ciclodextrinas con derivados del naftaleno, mostrando que el equilibrio huésped-anfitrión (1:1) no se ve alterado por la presencia de la butanodiona.^{30,41} Para poder comparar los resultados obtenidos, las medidas se realizaron usando una fracción de dímero del ~22% para cualquiera de las disoluciones de $XmCD$ s. Los resultados muestran representaciones de Stern-Volmer $\langle\tau\rangle_{q=0}/\langle\tau\rangle$ lineales en todo el intervalo de concentración del diacetilo ($0-7\times 10^{-2}$ M). Las constantes de desactivación bimolecular, k_q , a 25°C para las disoluciones acuosas de oXy , $Xm\alpha CD$, $Xm\beta CD$ y $Xm\gamma CD$ fueron de 2.5×10^9 , 1.3×10^9 , 1.3×10^9 , 2.0×10^9 $M^{-1}\cdot s^{-1}$, respectivamente. Estos resultados demuestran que, como era de esperar, el acceso del desactivador es mucho más favorable en el cromóforo cuando se encuentra de forma libre, oXy , que cuando se encuentra unido a una ciclodextrina y dentro de las $XmCD$ s, es la $Xm\gamma CD$ la que dispone el grupo Xy más accesible al desactivador. Este hecho solo puede ser debido a diferencias estructurales del dímero de $Xm\gamma CD$ en disolución con respecto a sus homólogas, como por ejemplo, a que la estructura del complejo $(Xm\gamma CD)_2$ sea algo más abierta. En ningún caso esto puede ser atribuido a la cantidad de dímero formado, ya que en todos los experimentos existe la misma fracción de $XmCD$ complejada.

La variación de k_q con la temperatura se representa en la Figura 8.9. El valor aumenta para todas las $XmCD$ por debajo de 25°C (en el caso de $Xm\gamma CD$ esta tendencia se mantiene a temperaturas superiores), lo que estaría de acuerdo con una disminución de la cantidad de dímero (al ser $\Delta H^0 < 0$) y una mayor accesibilidad del grupo Xy en el monómero. Este resultado también se esperaría en un proceso de desactivación dinámica controlado por la difusión de las especies y cuya eficiencia aumentaría a medida que disminuye la viscosidad del medio. Para temperaturas superiores a 25°C , se produce un cambio en esta tendencia observándose una disminución de k_q , lo que seguramente está causado por la agregación de las $Xm\alpha$ - y la $Xm\beta$ CDs. De forma experimental se observa que la solubilidad a las temperaturas más altas (superiores a 25°C) aumenta a medida que aumenta el tamaño de la $XmCD$, lo que explicaría este diferente comportamiento de cada $XmCD$ en los experimentos de desactivación.

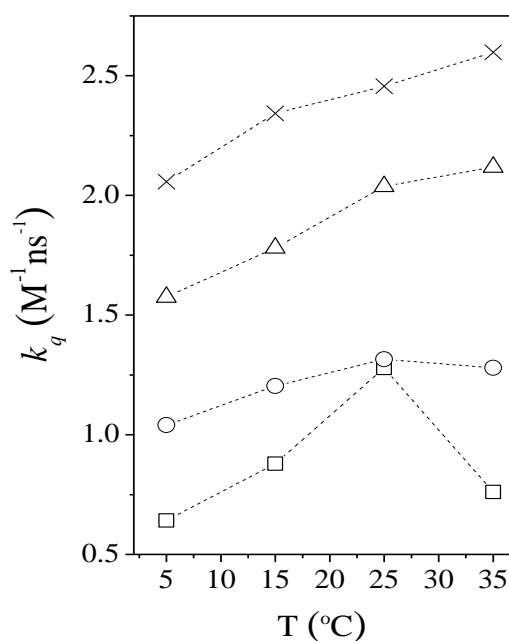


Figura 8.9. Variación de la constante bimolecular de desactivación (k_q) para $Xm\alpha CD$ (\square), $Xm\beta CD$ (\circ), $Xm\gamma CD$ (Δ) y oXy (\times) con la temperatura.

Estudio de procesos de heterodimerización

Para valorar la influencia que tiene el grupo Xy en la asociación intermolecular y poder determinar cuál va a ser la orientación más probable de la $XmCD$ en el dímero, se realizaron experimentos de heterodimerización de las $XmCD$ s con las mCD s (cada $XmCD$ con su mCD semejante) y de complejación de oXy con las mCD s en un intervalo

de temperatura de 5° a 45°C. La Figura 8.10 muestra los resultados obtenidos por tiempo de vida de fluorescencia. En ninguno de los casos se observa variación de la señal de fluorescencia de $XmCD$ con la concentración de mCD , lo que indica que no se produce la heterodimerización a ninguna temperatura. Por otra parte, el cromóforo oXy tampoco forma complejos ni con $m\beta CD$ ni con $m\gamma CD$, mientras que sí lo hace con $m\alpha CD$. Para esta última mCD , los resultados indican que el oXy se debe disponer en el interior de la cavidad dando lugar a un complejo de inclusión de estequiometría 1:1. La constante de complejación deducida a partir del análisis de los resultados experimentales es relativamente baja ($K \approx 140 \text{ M}^{-1}$ a 25°C). De estos resultados, y a pesar de que la CD más pequeña es capaz de complejarse con el oXy , se puede deducir que la penetración de este grupo Xy dentro de la cavidad de otra $XmCD$ al formarse el dímero es bastante improbable. Ello se debe, no solo a la poca afinidad del grupo oXy para formar complejos con las mCD , sino también a que el Xy en las $XmCD$ s está unido a una unidad de glucopiranososa con cadenas relativamente cortas a modo bisagra, haciendo que su inclusión en otra $XmCD$ vecina deba resultar estéricamente bastante impedida. Estos experimentos, además, demuestran que la formación de dímeros requiere la presencia cooperativa de dos grupos Xy , ya que ninguna $XmCD$ forma heterodímeros con su correspondiente mCD .

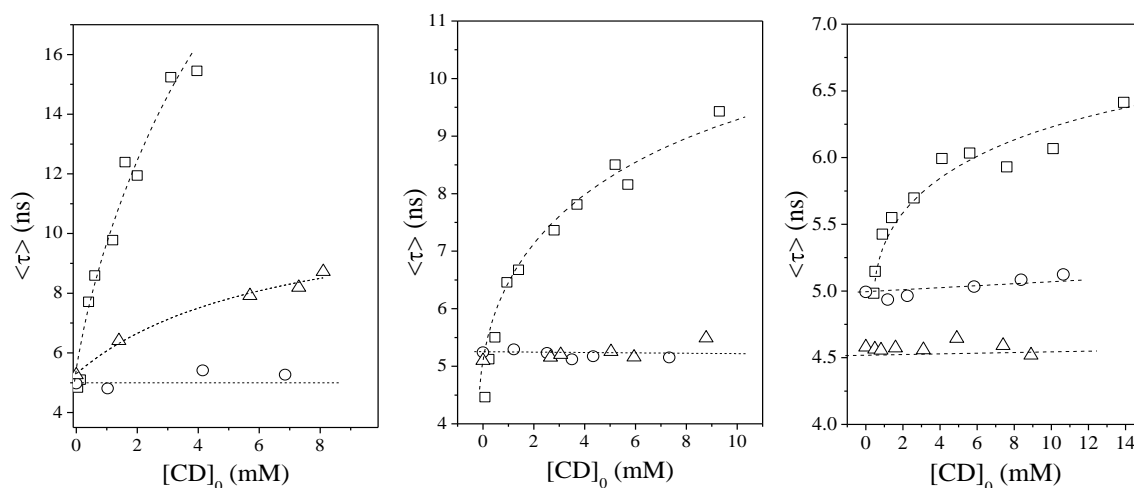


Figura 8.10. Variación de $\langle \tau \rangle$ para diferentes sistemas $Xm\alpha CD$ (izquierda), $Xm\beta CD$ (centro) y $Xm\gamma CD$ (derecha) a 25 °C. Los sistemas son: solo $XmCD$ (\square); oXy ($< 10^{-5} \text{ M}$, fija) añadiendo concentraciones variables de mCD (\triangle); y $XmCD$ ($\sim 0.047 \text{ M}$, fija) añadiendo concentraciones variables de mCD (\circ).

Estudio teórico: Mecánica y Dinámica Molecular**Comportamiento conformacional del monómero XmCD**

Examinando las distribuciones de probabilidad sobre cada ángulo de torsión ϕ y ψ_i para cada uno de los monómeros de las XmCDs obtenidas del análisis de trayectorias de Dinámica Molecular (DM) de 1 ns en el vacío a diferentes temperaturas, se observa que la presencia de los grupos metilos y del sustituyente Xy en la cara secundaria, no modifica significativamente la forma de estas distribuciones con respecto a las CDs naturales.⁴² Aunque ambos ángulos prefieren adoptar conformaciones próximas al estado *trans* de $0 \pm 60^\circ$ (fijado el estado *trans* a 0°), ψ_i puede visitar alguna vez el estado *cis* (180°) responsable de la distorsión del macrociclo.⁴² El estado *cis* orienta los grupos $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ de dos unidades de glucopiranosas contiguas en direcciones opuestas, hacia dentro y fuera de la cavidad de la CD respectivamente. Cuando se alcanza esta conformación en el ángulo ψ más cercano a la glucopiranosas que contiene el cromóforo Xy, provoca que este grupo se disponga de tal forma que parcialmente bloquea la entrada de la cavidad de la CD, dando lugar a una estructura tipo “*tapadera*”. Por el contrario, si el ángulo ψ se encuentra en su posición natural *trans*, el grupo Xy se encuentra más alejado de la cavidad secundaria y la conformación más favorable es de tipo “*abierta*”. Los resultados también muestran que a cualquier temperatura la Xm γ CD se muestra más flexible que la Xm β CD y ésta más que Xm α CD. Los ángulos de torsión alrededor del grupo éter ($-\text{C}(3)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{ar}}-$ y $\text{C}(2)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{ar}}-$) que describen la rotación alrededor de los enlaces que unen el benceno del grupo Xy con la CD, apenas cambian durante la dinámica desde la primera estructura optimizada de partida. Esto se traduce en que estos ángulos apenas influyen en que la XmCD adopte una conformación *abierta* o *tapadera* y que los verdaderos responsables de esas dos disposiciones son los ángulos ϕ y ψ_i , especialmente este último. Mediante el análisis de la DM también se obtuvo la distribución de distancias entre el centro de masas del anillo benceno del grupo Xy y el centro de masas de cada macrociclo (Figura 8.11 para Xm α CD y Xm β CD, y Figura 8.12 para Xm γ CD). Esa distancia se puede relacionar con la presencia de conformaciones *abierta* o *tapadera*. De hecho, los puntos “isoprobables” que aparecen para Xm α CD y Xm β CD demuestran la existencia de un equilibrio conformacional *tapadera* \rightleftharpoons *abierta*. La forma de esta distribución indica que el sustituyente Xy prefiere localizarse a distancias mayores de $\sim 5.5 \text{ \AA}$ para Xm α CD y $\sim 7.5 \text{ \AA}$ para Xm β CD en las conformaciones *abiertas* y que a medida que aumenta la temperatura, la fracción de moléculas de Xm α CD y Xm β CD que

presentan la conformación *tapadera* aumenta ligeramente. Se puede concluir que la conformación *abierta* es más estable que la *tapadera* y que el equilibrio, por tanto, está más desplazado hacia la conformación *abierta*. En el caso de la $Xm\gamma$ CD (Figura 8.12), la distribución muestra un único máximo a todas las temperaturas. La distancia media aumenta con la temperatura, lo que puede ser debido a la alta flexibilidad de este macrociclo comparado con $Xm\alpha$ CD y $Xm\beta$ CD. El análisis no presenta ningún punto isoprobable, lo que pone de manifiesto que el equilibrio está claramente desplazado hacia una única conformación predominante, la *abierta*. Por otro lado, para ninguna de las tres Xm CD hay indicios de autoinclusión del grupo Xy .

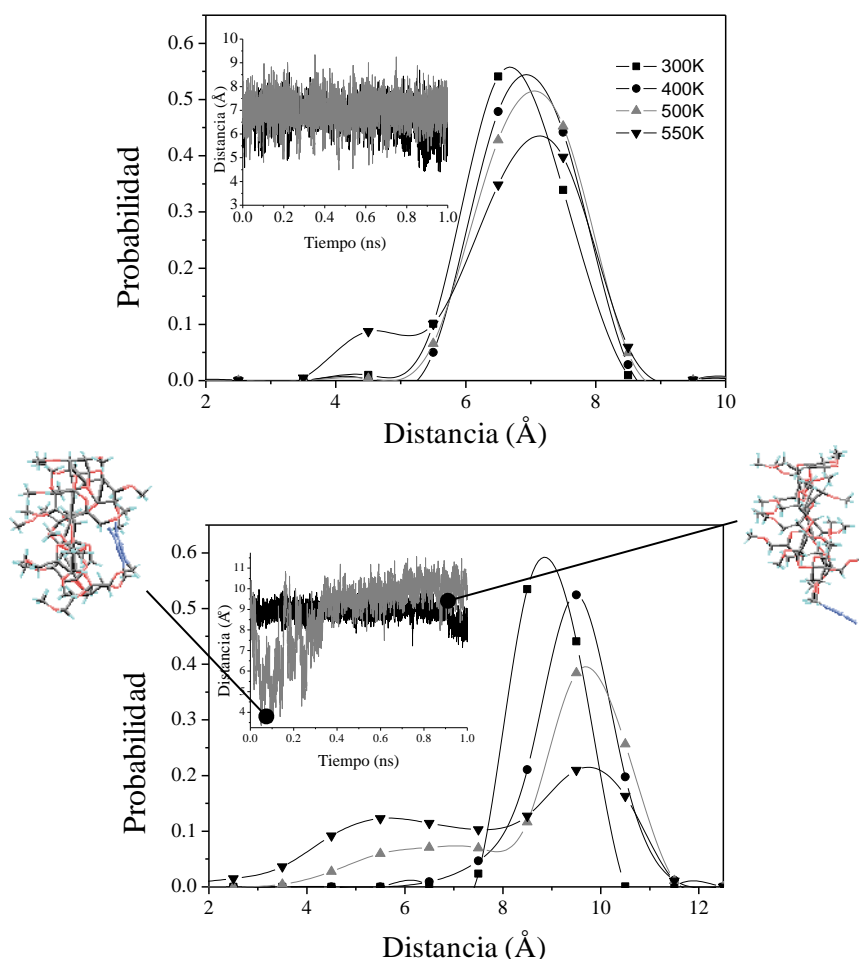


Figura 8.11. Función de distribución de la distancia (en Å) entre el centro de masas del benceno del grupo xilileno y el centro de masas del macroanillo de oxígenos puente de la CD para Xma CD (*superior*) y $Xm\beta$ CD (*inferior*). Superpuestas aparecen las historias de estas distancias a 300 K (negro) y 500K (gris) y dos conformaciones tipo “*tapadera*” (izquierda) y “*abierta*” (derecha) para $Xm\beta$ CD (análisis de la trayectoria de DM a 500 K).

En las Figura 8.11 y 8.12 se representan a modo de ejemplo dos conformaciones límite *tapadera* y *abierta* para el caso de la $Xm\beta$ CD y algunas de esas conformaciones para el caso de la $Xm\gamma$ CD. Los resultados sugieren que la inclusión de moléculas huésped a través de la cara secundaria puede ser factible a la temperatura de nuestros experimentos. La complejación huésped-anfitrión competirá con el equilibrio *dímero* \rightleftharpoons *monómero*, que debido a las constantes de dimerización tan bajas, estará desplazado hacia la forma *monómero*. A su vez el *monómero* se encontrará en su conformación más *abierta*, tal y como indicamos en el equilibrio *tapadera* \rightleftharpoons *abierta*, facilitando así la entrada del huésped a la cavidad. La representación de todos estos procesos competitivos se resume en el Esquema 8.1. Todos estos resultados están de acuerdo con el estudio de RMN previamente descrito.^{27,28}

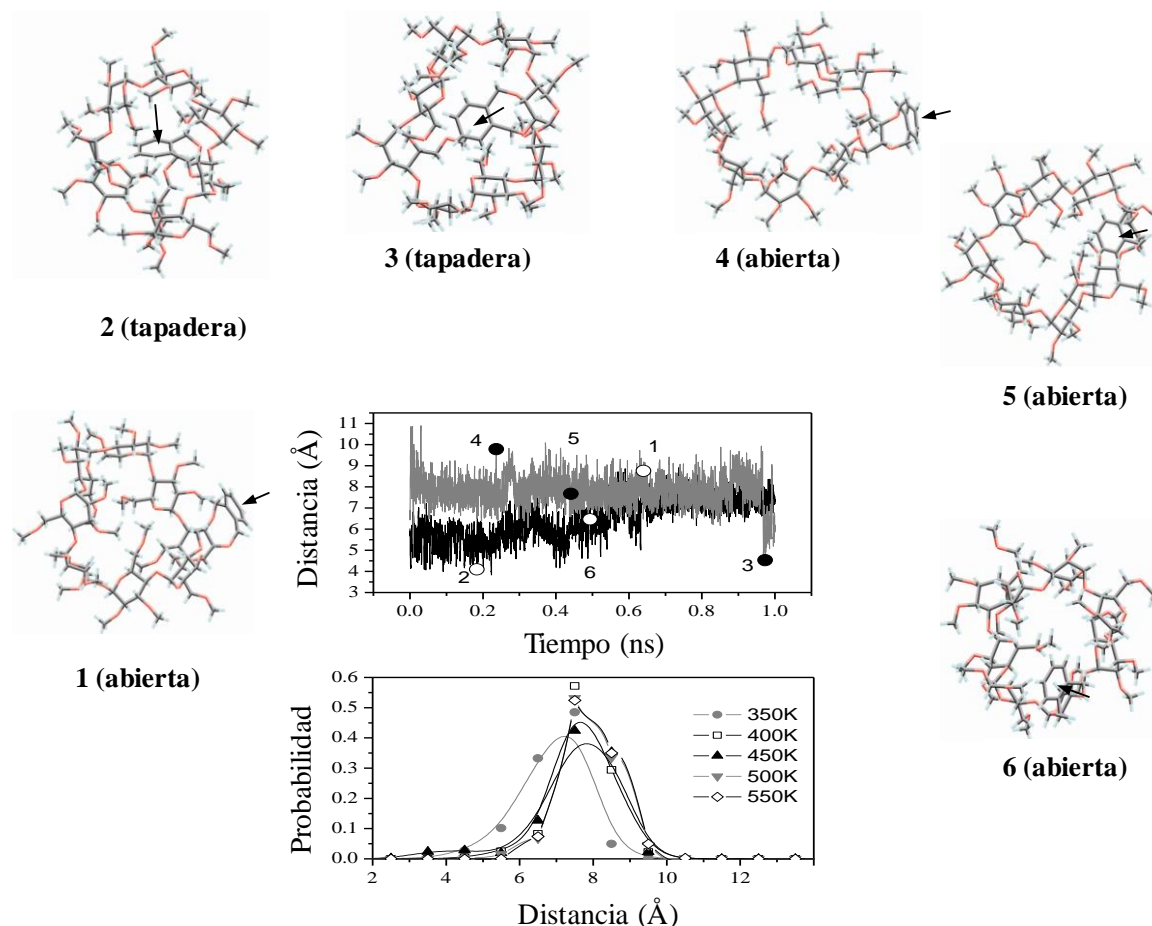
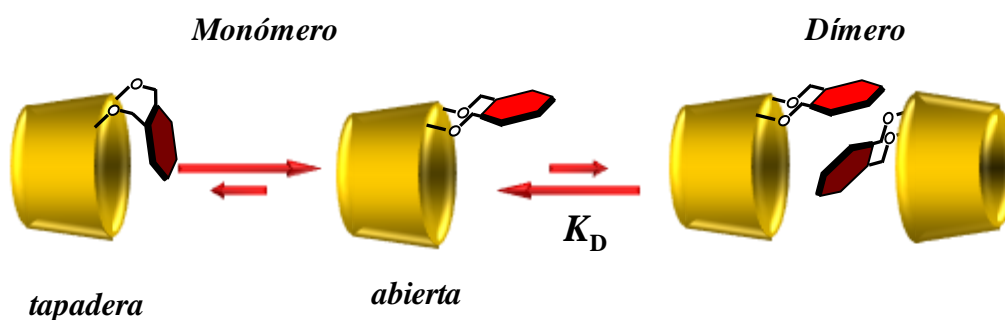


Figura 8.12. Historia de la distancia (en Å) entre el centro de masas del anillo bencénico del grupo xilileno y el centro de masas de los oxígenos puente del macroanillo de la CD para $Xm\gamma$ CDs a 300 K (negro) y 500 K (gris) (*superior*). Varias conformaciones tipo “*tapadera*” y “*abierta*” obtenidas de estas trayectorias se disponen superpuestas. Las funciones de distribución para esta distancia en la misma CD a diferentes temperaturas (*inferior*). La media de las distancias fueron: 6.9 ± 0.8 Å; 7.7 ± 0.7 Å; 7.5 ± 1.1 Å; 7.8 ± 0.7 Å y 7.9 ± 0.6 Å a las temperaturas de 350, 400, 450, 500 y 550 K respectivamente.

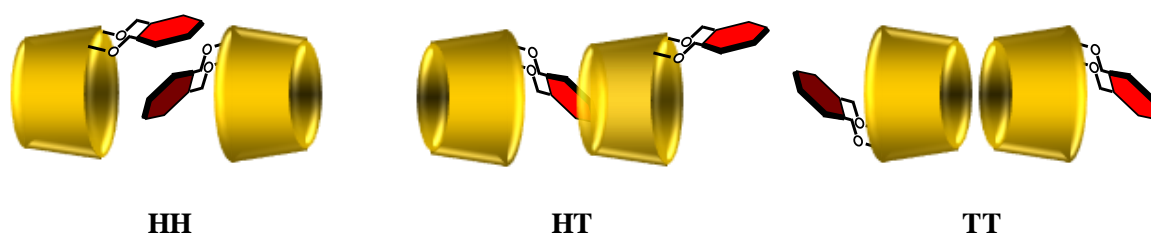
La presencia de agua en los cálculos de DM hace que los cambios conformacionales y estructurales de la CD sean más realistas pero mucho más costosos en tiempo de CPU, requiriendo además trayectorias más largas de DM para realizar un barrido razonable del espacio conformacional. Sin embargo, el análisis de las trayectorias de 3 ns en presencia de agua para los mismos sistemas, mostró resultados similares.



Esquema 8.1. Representación esquemática del equilibrio conformacional del monómero y del proceso de dimerización para XmCD.

Estudio del proceso de dimerización

La Figura 8.13 muestra los cambios de la energía de interacción durante el proceso de dimerización en función de la distancia entre los centros de masas de dos XmCDs para cada uno de los tres tipos de aproximaciones que “a priori” se pueden presentar: cabeza-cabeza (HH), cabeza-cola (HT) y cola-cola (TT) (Esquema 8.2).



Esquema 8.2. Representación esquemática de las posibles conformaciones del dímero $(XmCD)_2$: cabeza-cabeza (HH) (izquierda), cabeza-cola (HT) (medio) y cola-cola (TT) (derecha).

La conformación *abierta* fue la estructura optimizada de partida para la realización de todos los cálculos. Aunque los tres tipos de conformaciones HH, HT o TT del dímero tienen valores de energía muy diferentes, todos muestran interacciones favorables en la conformación de mínima energía de interacción. Las fuerzas responsables de estas

disposiciones son principalmente interacciones atractivas de tipo van der Waals, lo que estaría de acuerdo con el valor obtenido para $\Delta H^0 < 0$. Las interacciones electrostáticas apenas cambian con la dimerización y son menos significativas a cualquier distancia entre ciclodextrinas.

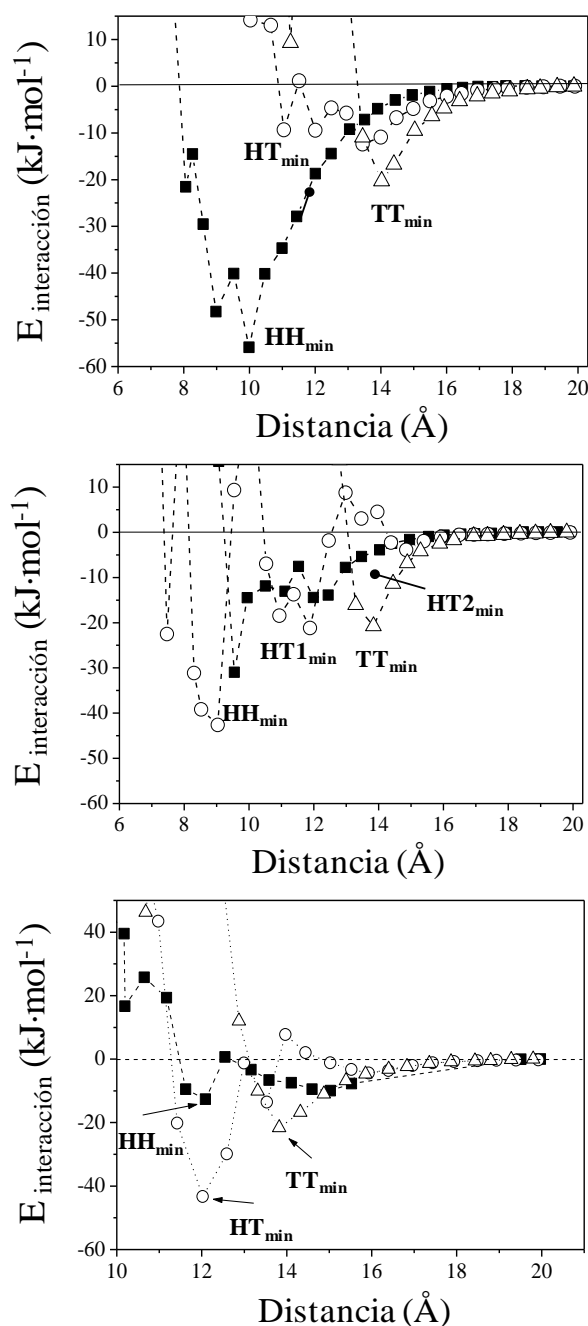


Figura 8.13. Variación de la energía de interacción cuando una segunda X m CD se aproxima a la X m CD con diferentes orientaciones: HH (■), HT (○), y TT (△), para X α CD (*superior*), X β CD (*medio*) y X γ CD (*inferior*). Las abreviaturas y flechas indican las conformaciones de mínimos de energía de interacción cuyos parámetros geométricos y energéticos se recogen en las Tablas 8.3, 8.4 y 8.5.

Tabla 8.3. Energía de interacción y las contribuciones de los diferentes tipos de energías ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), así como algunos parámetros geométricos para las estructuras de mínima energía de interacción (min) y para las conformaciones con mayor separación $XmCD-XmCD$ (∞) para $Xm\alpha CD$ en las aproximaciones HH, HT y TT. ϵ permanece cerca de 90° .

Parámetros	HH _{min}	HH _{∞}	HT _{min}	HT _{∞}	TT _{min}	TT _{∞}
Distancia (Å)	10.0	19.9	13.4	19.9	14.0	19.9
Distancia $Xy1-Xy2$ (Å)	6.9	12.6	13.6	19.9	23.2	29.3
θ ($^\circ$)	80.5	78.6	-21.2	-22.6	91.5	90.9
$E_{\text{interacción}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-55.9	0	-12.4	0	-20.3	0
electrostática	-3.4	0	2.8	0.0	4.6	-0.0
van der Waals	-52.5	0	-15.2	-0.0	-24.9	0
$E_{\text{inter}} Xy2-XmCD1$	-12.2	0.0	-4.9	0	0	0
electrostática	-0.7	0	2.4	0.0	0	-0.0
van der Waals	-11.5	0	-7.3	-0.0	0	-0.0
$E_{\text{inter}} Xy1-XmCD2$	-17.4	0.0	0	0.0	0.0	0
electrostática	-1.1	0	0	-0.0	0.0	-0.0
van der Waals	-16.3	0	0.0	0	0	0
$E_{\text{inter}} Xy1-Xy2$	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0
electrostática	1.1	0	0	0	0	0
van der Waals	-1.7	0	0	0	0	0

Tabla 8.4. Energía de interacción y las contribuciones de los diferentes tipos de energías ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), así como algunos parámetros geométricos para las estructuras de mínima energía de interacción (min) y para las conformaciones con mayor separación $XmCD-XmCD$ (∞) para $Xm\beta CD$ en las aproximaciones HH, HT y TT. ϵ permanece cerca de 90° .

Parámetros	HH _{min}	HH _{∞}	HT1 _{min}	HT2 _{min}	HT _{∞}	TT _{min}	TT _{∞}
Distancia (Å)	9.6	18.5	11.9	14.9	19.9	13.8	19.8
Distancia $Xy1-Xy2$ (Å)	6.4	12.1	14.3	16.7	21.1	23.9	29.6
θ ($^\circ$)	-22.8	-22.8	-74.8	-74.3	-74.9	17.6	16.4
$E_{\text{interacción}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-31.0	0.0	-21.2	-3.9	-0.0	-20.7	-0.0
electrostática	8.6	0.1	0.9	3.8	0	12.2	-0.0
van der Waals	-39.5	-0.0	-22.0	-7.7	-0.0	-32.9	0
$E_{\text{inter}} Xy2-XmCD1$	0.7	0.1	0	0	0	0	-0.0
electrostática	-2.0	0.1	0.0	0	-0.0	0	-0.0
van der Waals	2.8	-0.0	0.0	0.0	0	-0.0	0
$E_{\text{inter}} Xy1-XmCD2$	-0.9	0.1	-4.9	-3.1	-0.0	0	0
electrostática	-6.1	0.1	-5.7	1.8	-0.0	0	0
van der Waals	5.2	-0.0	0.8	-4.8	-0.0	0	0.0
$E_{\text{inter}} Xy1-Xy2$	-3.3	0.1	0	0	0	0.0	0
electrostática	-0.72	0.1	0	0.0	-0.0	0	0.0
van der Waals	-2.6	-0.0	0.0	0	0	-0.0	0

Tabla 8.5. Energía de interacción y las contribuciones de los diferentes tipos de energías (kJ·mol⁻¹), así como algunos parámetros geométricos para las estructuras de mínima energía de interacción (min) y para las conformaciones con mayor separación $XmCD-XmCD$ (∞) para $Xm\gamma CD$ en las aproximaciones HH, HT y TT. ϵ permanece cerca de 90°.

Parámetros	HH _{min}	HH _{∞}	HT _{min}	HT _{∞}	TT _{min}	TT _{∞}
Distancia (Å)	12.1	20.0	12.0	19.9	13.8	19.8
Distancia $Xy1-Xy2$ (Å)	4.5	9.3	12.3	20.2	24.6	30.6
θ (°)	30.2	30.3	18.8	18.6	13.8	90.9
$E_{interacción}$ (kJ·mol ⁻¹)	-12.6	-0.0	-43.3	-0.0	-21.6	0
electrostática	3,9	0.2	2.0	0.0	6.0	-0.0
van der Waals	-16.5	-0.2	-45.3	-0.0	-27.6	0
$E_{inter} Xy2-XmCD1$	9.2	-0.0	-11.6	-0.0	0	0
electrostática	1.2	0.2	-5.4	0.0	0	-0.0
van der Waals	8,0	-0.2	-6.2	-0.0	-0.0	0
$E_{inter} Xy1-XmCD2$	-5.5	-0.0	0	0	0.0	0
electrostática	2.6	0.2	0	0.0	0	0
van der Waals	-8.1	-0.2	-0.0	0	0.0	0
$E_{inter} Xy1-Xy2$	5.0	-0.0	0	-0.0	0.0	0
electrostáticas	5.1	0.2	0	0	0	0
van der Waals	-0.0	-0.2	-0.0	0.0	-0.0	0

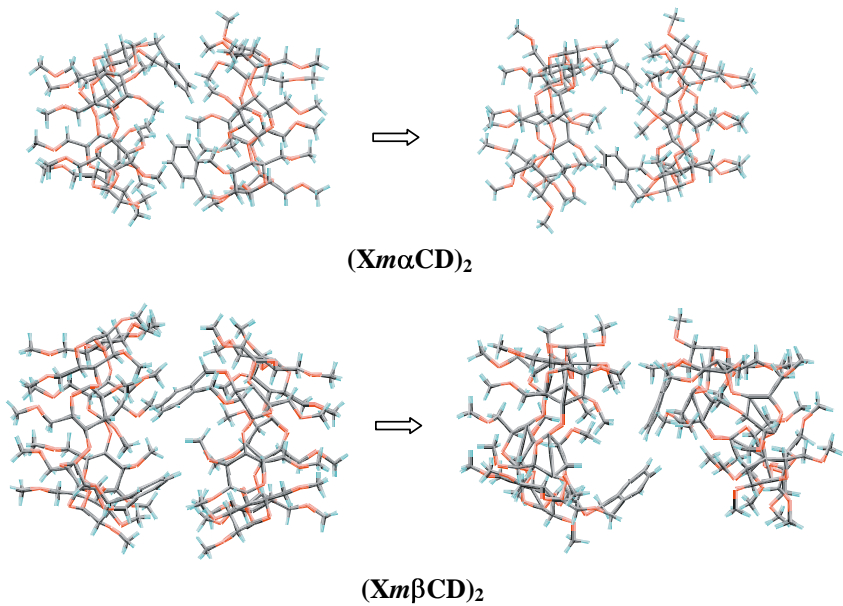


Figura 8.14. Conformaciones de mínima energía para los dímeros HH ($Xm\alpha CD$)₂ (*superior*) y HH- ($Xm\beta CD$)₂ (*inferior*) obtenidas mediante MM (*izquierda*) y DM (*derecha*).

Para $Xm\alpha$ CD y $Xm\beta$ CD, la disposición del dímero más favorable es HH. La Figura 8.14 muestra las conformaciones de mínima energía para los dímeros HH. Para ambas Xm CDs, los grupos Xy cromóforo adoptan una conformación *abierta* y se colocan relativamente cerca uno de otro (6.9 y 6.4 Å para $Xm\alpha$ CD y $Xm\beta$ CD, respectivamente) pero no son capaces de alcanzar configuraciones tipo sándwich, lo que estaría de acuerdo con la ausencia de bandas exciméricas en el espectro de emisión (ver Figura 8.1). Este tipo de disposición, donde los cromóforos Xy se encuentran situados entre las dos ciclodextrinas interactuando pero sin producirse una penetración en el interior de la cavidad de la ciclodextrina vecina, respaldaría que el compuesto modelo oXy no forme complejo de inclusión con la $m\beta$ CD. A pesar de que oXy sí que lo forma con $m\alpha$ CD, el grupo Xy unido a la cara secundaria en forma de bisagra bidentada es bastante compacto y alcanzar la cavidad de la Xm CD vecina al formarse el dímero implicaría grandes repulsiones entre los anillos de los macrociclos. Además, el hecho de que ninguna de estas dos Xm CDs forme heterodímeros con m CDs, también apoyaría la disposición HH como la más favorable frente a las HT y TT. Aunque la inclusión de los grupos Xy no se da, sí que la disposición entre las cavidades de las Xm CDs proporciona una protección de los grupos cromóforos frente al disolvente, lo que estaría de acuerdo con los experimentos de desactivación de fluorescencia.

La Figura 8.15 muestra la variación en la energía de interacción obtenida del análisis de las trayectorias de DM de 1.0 ns para las conformaciones HH, HT y TT de $(Xm\alpha$ CD)₂ y $(Xm\beta$ CD)₂, partiendo de las estructuras de los dímeros de más favorable energía de interacción obtenidos por MM. Se observa claramente que para las dos Xm CDs la disposición HH es la más estable, de hecho, los dímeros en forma HT y TT, se disocian durante la trayectoria. Las estructuras de mínima energía de interacción obtenidas por DM son muy similares a las que se obtuvieron por MM (Figura 8.14).

Como se muestra en la Figura 8.16, al igual que para los otros dos tipos de Xm CD, la conformación HH es la más favorable para $(Xm\gamma$ CD)₂ y el dímero TT es muy inestable y se rompe rápidamente. Sin embargo para $Xm\gamma$ CD, la disposición HT también muestra interacciones favorables a lo largo de la mayor parte de la trayectoria, aunque se disocia en la última etapa de la misma. Una disposición HH estaría de acuerdo con muchas de las evidencias experimentales donde los dímeros $(Xm\gamma$ CD)₂ se forman de manera espontánea en disolución y con el hecho de que no se den los heterodímeros $Xm\gamma$ CD/ $m\gamma$ CD. No obstante, la estructura del tipo HT respaldaría los experimentos de desactivación de

fluorescencia, donde el grupo Xy es mucho más accesible en $(Xm\gamma CD)_2$ que en sus análogos $(Xm\alpha CD)_2$ y $(Xm\beta CD)_2$. En la Figura 8.17 se muestran las estructuras de mínima energía obtenidas por MM para los dos tipos de dímeros HH y HT $(Xm\gamma CD)_2$ usadas como conformaciones de partida para las simulaciones de DM, y las conformaciones de mínima energía de interacción obtenidas por este último método.

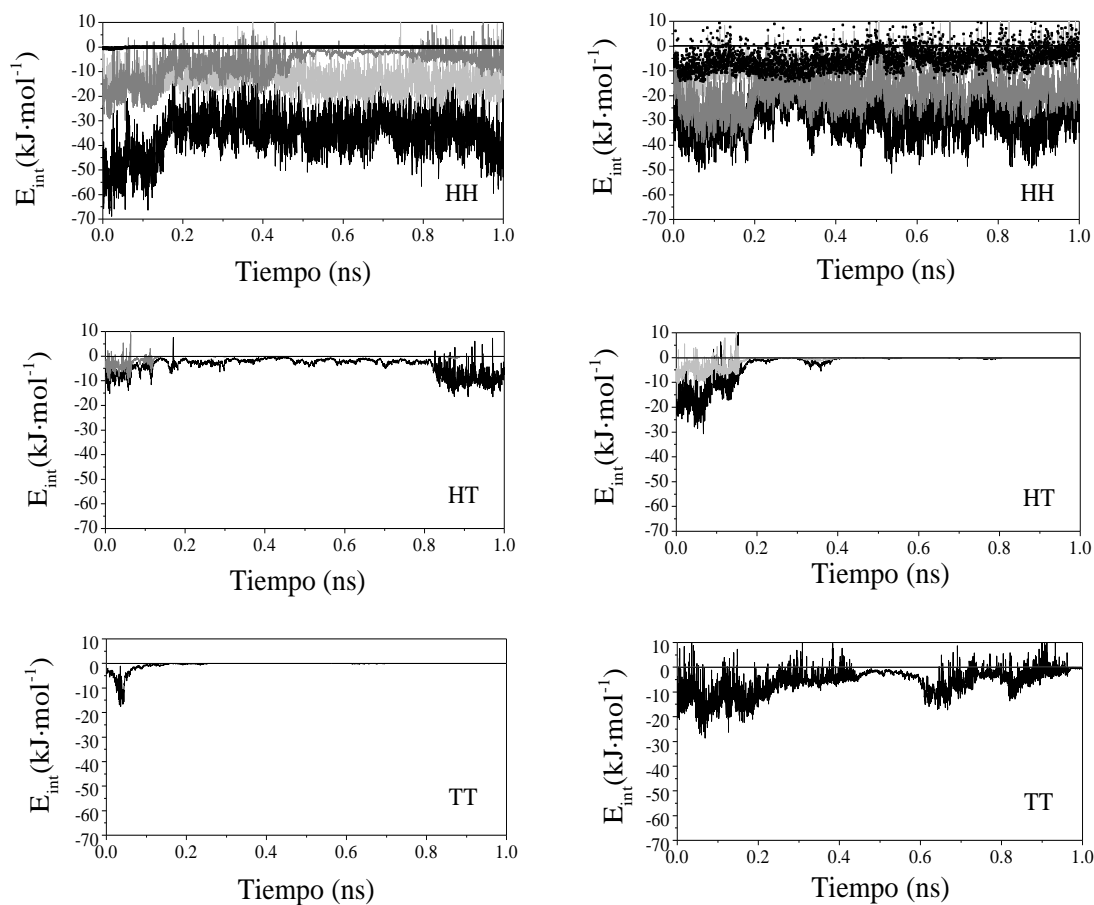


Figura 8.15. Historias de las energías de interacción para las diferentes conformaciones del dímero HH, HT y HT para $(Xm\alpha CD)_2$ (izquierda) y $(Xm\beta CD)_2$ (derecha) obtenidas del análisis de la trayectoria de DM de 1.0 ns en presencia de agua a 300K: E_{int} (negro), E_{int} Xy1-XmCD2 (gris claro), E_{int} Xy2-XmCD1 (gris oscuro) and E_{int} Xy1-Xy2 (símbolos negros).

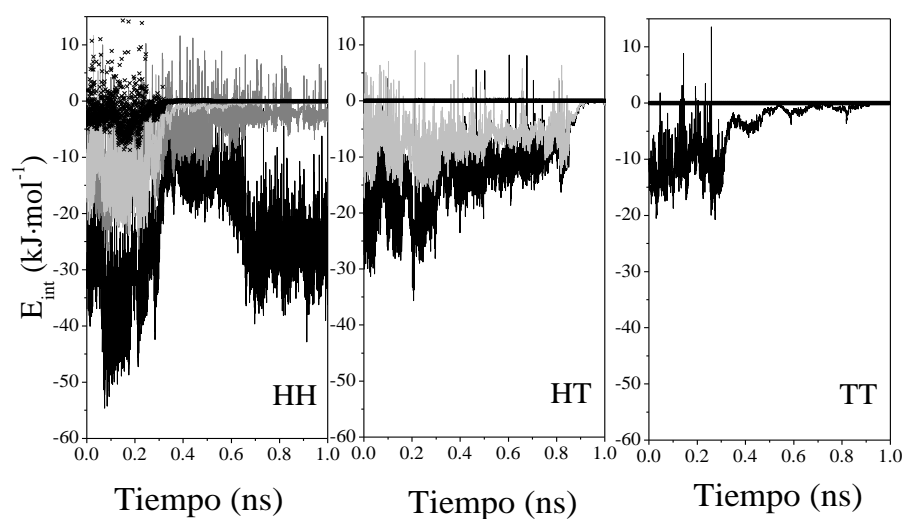


Figura 8.16. Historias de las energías de interacción para las diferentes conformaciones del dímero HH, HT y TT para $(Xm\gamma CD)_2$ obtenidas de la trayectoria de 1.0 ns por DM en presencia de agua a 300K: $E_{interacción}$ (negro), $E_{inter Xyl-XmCD2}$ (gris claro), $E_{inter Xyl2-XmCD1}$ (gris oscuro) y $E_{inter Xyl-Xyl2}$ (símbolos negros).

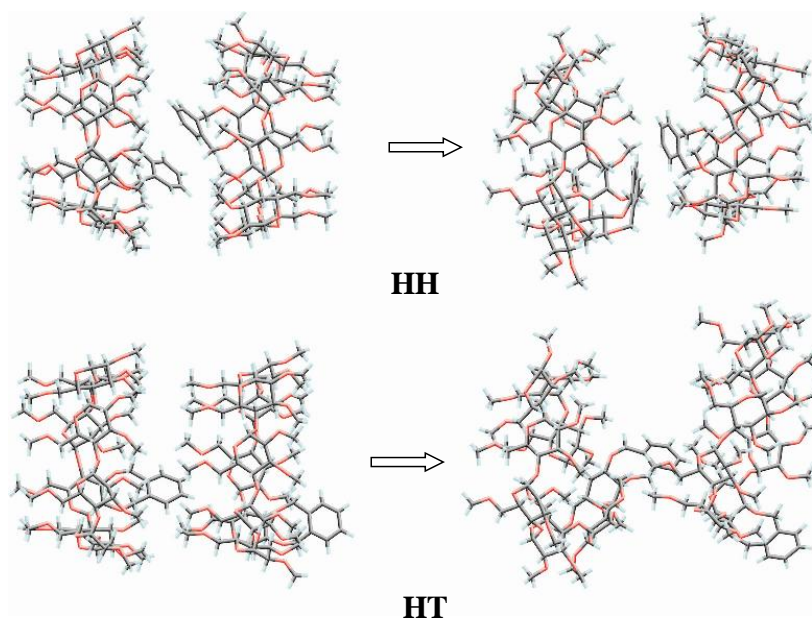


Figura 8.17. Conformaciones de mínima energía de interacción para los dímeros HH $(Xm\gamma CD)_2$ (*superior*) y HT $(Xm\gamma CD)_2$ (*inferior*) obtenidas mediante MM (*izquierda*) y DM (*derecha*).

Debido a la presencia de dímeros HT, se podría pensar en la formación de estructuras tipo oligómeros compuestas por un número elevado de unidades de $Xm\gamma CD$ donde todas las $Xm\gamma CD$ tuviesen orientación HT. Para comprobarlo, aplicamos cálculos que combinan MM y DM sobre un trímero con orientación HT (más detalles sobre el procedimiento en el Capítulo 5, apartado 5.4.2). En la Figura 8.18 se representan las energías de interacción entre pares de $Xm\gamma CD$ vecinas en el trímero, es decir entre las $Xm\gamma CD$ s número 1-2 y entre las 2-3. Las interacciones de las $Xm\gamma CD$ s 1 y 2 son favorables durante toda la trayectoria, mientras que después del primer tercio, para las $Xm\gamma CD$ s 2 y 3 la interacción entre ellas prácticamente desaparece. De esto se concluye que el dímero sí que es favorable, pero la adición de una tercera $Xm\gamma CD$ no estabiliza el sistema y la tendencia es a disociarse.

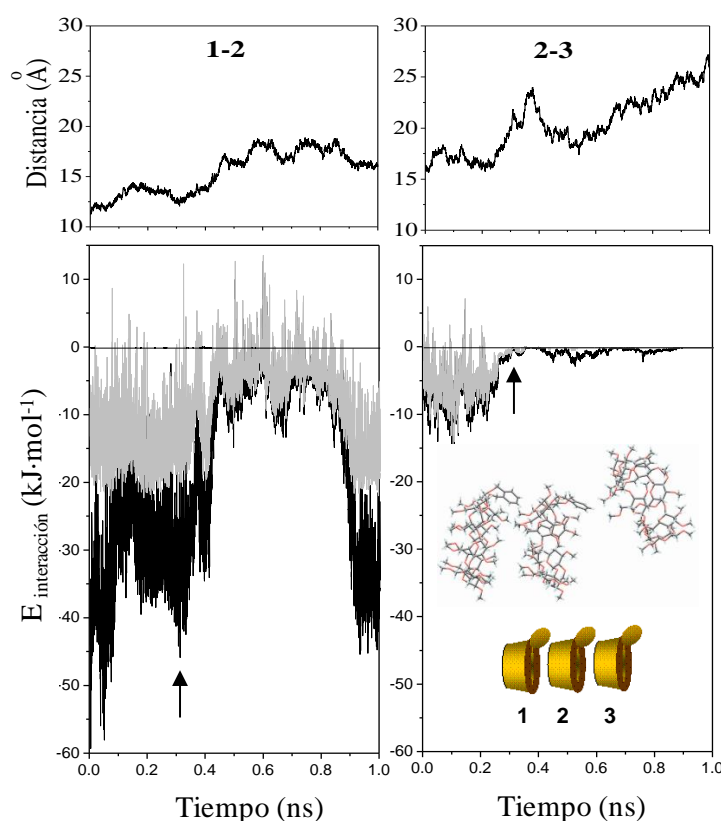


Figura 8.18. Historias de las energías de interacción para un trímero $(Xm\gamma CD)_3$ con sus unidades $Xm\gamma CD$ dispuestas de forma HT para una trayectoria de DM de 1ns a 300K. Energías de interacción: (izquierda) $Xm\gamma CD(1)-Xm\gamma CD(2)$ (negro), $Xy1-Xm\gamma CD2$ (gris claro); (derecha) $Xm\gamma CD(2)-Xm\gamma CD(3)$ (negro) y $Xy2-Xm\gamma CD3$ (gris claro). Otras interacciones como $Xy-Xm\gamma CD$ o $Xy-Xy$ son despreciables.

8.3 Conclusiones

Se han utilizado diferentes técnicas de fluorescencia de estado estacionario y tiempos de vida, junto a simulaciones de MM y DM en el estudio de los procesos de dimerización de las 2^I,3^I-O-(*o*-xilileno)-per-O-Me- α -, β - y γ -CDs en agua.

El promedio de tiempo de vida obtenido de los ajustes de los perfiles de decaimiento de fluorescencia han permitido obtener las constantes de dimerización, K_D , a diferentes temperaturas. Las constantes de dimerización son relativamente bajas y siguen la tendencia $K_D(Xm\gamma CD) > K_D(Xm\beta CD) > K_D(Xm\alpha CD)$. Los parámetros termodinámicos se calcularon a partir de K_D empleando representaciones lineales de van't Hoff. Para todas las Xm CDs, el proceso de dimerización está gobernado entálpicamente, pero desfavorecido entrópicamente. El valor de $\Delta H^0 < 0$ es típico de fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas, mientras que $\Delta S^0 < 0$ corresponde a la pérdida de grados de libertad rotacionales y traslacionales que tiene lugar durante la asociación. Por otro lado, la desactivación de fluorescencia indica que el grupo Xy se encuentra más accesible en el caso de la $Xm\gamma CD$, que en la $Xm\alpha CD$ y $Xm\beta CD$, pudiendo ser debido a que $(Xm\gamma CD)_2$ se disponga en una estructura más abierta. Además, ninguna de las tres Xm CDs forma heterodímeros y solamente $m\alpha CD$ forma un débil complejo de inclusión con el cromóforo oXy; de ello se concluye que es necesaria la presencia de dos cromóforos para la formación del dímero.

Los cálculos por MM y DM de los monómeros $XmCD$ en el vacío y en agua, permitieron demostrar la presencia de un equilibrio del tipo *tapadera* \rightleftharpoons *abierta*, entre dos formas de los monómeros, para el caso de la $Xm\alpha CD$ y $Xm\beta CD$. Este equilibrio está claramente desplazado hacia la forma *abierta*. MM y DM también aportan información sobre la geometría y estabilidad del dímero. Los resultados teóricos obtenidos están de acuerdo con las conclusiones experimentales, indicando que el dímero más estable debe tener preferentemente una disposición tipo HH. En esta conformación, los grupos Xy se encuentran próximos e interaccionando favorablemente, pero sin formar estructuras tipo sándwich y sin penetrar en la cavidad de la $XmCD$ vecina. En el caso del dímero $(Xm\gamma CD)_2$ la disposición HT también es posible y se encuentra respaldada por los datos de desactivación de fluorescencia. La presencia de estructuras formadas por asociaciones de más de dos unidades HT orientadas parece ser energéticamente poco favorable.

8.4 Referencias

- (1) Hamasaki, K.; Ikeda, H.; Nakamura, A.; Ueno, A.; Toda, F.; Suzuki, I.; Osa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5035.
- (2) Ikeda, H.; Nakamura, M.; Ise, N.; Oguma, N.; Nakamura, A.; Ikeda, T.; Toda, F.; Ueno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10980.
- (3) Ikeda, H.; Nakamura, M.; Ise, N.; Toda, F.; Ueno, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1411.
- (4) Ikeda, H.; Murayama, T.; Ueno, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4262.
- (5) Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8*, 4961.
- (6) Tamura, M.; Gao, D.; Ueno, A. *Chem.-Eur. J.* **2001**, *7*, 1390.
- (7) Jullien, L.; Canceill, J.; Valeur, B.; Bardez, E.; Lehn, J.-M. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2582.
- (8) Hoshino, T.; Miyauchi, M.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9876.
- (9) Fujimoto, T.; Uejima, Y.; Imaki, H.; Kawarabayashi, N.; Jung, J. H.; Sakata, Y.; Kaneda, T. *Chem. Lett.* **2000**, 564.
- (10) Fujimoto, T.; Sakata, Y.; Kaneda, T. *Chem. Lett.* **2000**, 764.
- (11) Park, K. K.; Kim, Y. S.; Lee, S. Y.; Song, H. E.; Park, J. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2114.
- (12) Harada, A.; Miyauchi, M.; Hoshino, T. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 3519.
- (13) Miyauchi, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2984.
- (14) Miyauchi, M.; Hoshino, T.; Yamaguchi, H.; Kamitori, S.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2034.
- (15) Miyauchi, M.; Harada, A. *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 104.
- (16) Mirzoian, A.; Kaifer, A. E. *Chem. Commun.* **1999**, 1603.
- (17) Inoue, Y.; Wada, T.; Sugahara, N.; Yamamoto, K.; Kimura, K.; Tong, L.-H.; Gao, X.-M.; Hou, Z.-J.; Liu, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8041.
- (18) Liu, Y.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Yang, Y.-W.; Ding, F.; Liu, S.-X.; Wu, X.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8345.
- (19) Liu, Y.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Diao, C.-H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 251.

- (20) Eliadou, K.; Giastas, P.; Yannakopoulou, K.; Mavridis, I. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8550.
- (21) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 5177.
- (22) Fujimoto, T.; Nakamura, A.; Inoue, Y.; Sakata, Y.; Kaneda, T. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7987.
- (23) Park, J. W.; Lee, S. Y.; Song, H. J.; Park, K. K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9505.
- (24) Yamauchi, K.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5024.
- (25) Liu, Y.; Chen, Y. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 681.
- (26) Engeldinger, E.; Armspach, D.; Matt, D. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4147.
- (27) Balbuena, P.; Lesur, D.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Commun.* **2007**, 3270.
- (28) González-Álvarez, M. J.; Balbuena, P.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717.
- (29) González-Álvarez, M. J.; Vicente, J.; Ortiz Mellet, C.; Fernández García, J. M.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975.
- (30) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1579.
- (31) Uekama, K.; Irie, T. En *Cyclodextrins and their industrial uses* 3rd ed.; D.Duchême Edition Sante: Paris, 1987.
- (32) Aree, T.; Hoier, H.; Schulz, B.; Reck, G.; Saenger, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 897.
- (33) Jeffrey, G. En *Comprehensive supramolecular chemistry*; 3rd ed.; Atwood, J., Davies, J., MacNicol, D., Vögtle, F., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1996; Vol. 6.
- (34) Starikov, E. B.; Brasicke, K.; Knapp, E. W.; Saenger, W. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *336*, 504.
- (35) Cervero, M.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1572.
- (36) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875.
- (37) Harrison, J. C.; Eftink, M. R. *Biopolymers* **1982**, *21*, 1153.
- (38) Rekharsky, M. V.; Schwarz, F. P.; Tewari, Y. B.; Goldberg, R. N.; Tanaka, M.; Yamashoji, Y. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4098.
- (39) Mendicuti, F. *Trends Phys. Chem.* **2006**, *11*, 61.

- (40) Nakamura, A.; Sato, S.; Hamasaki, K.; Ueno, A.; Toda, F. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 10952.
- (41) Usero, R.; Alvariza, C.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2008**, 18, 1103.
- (42) Pozuelo, J.; Madrid, J. M.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *Comput. Theor. Polym. Sci.* **1996**, 6, 125.

**Estudio de la Dimerización y
Heteroasociación de Ciclodextrinas
Modificadas con Naftaleno**

9.1 Introducción

El grupo naftaleno tiene una relativa alta eficiencia cuántica de fluorescencia y es particularmente atractivo para numerosas aplicaciones, por ejemplo, como dispositivos fotoquímicos¹ y sensores fluorescentes moleculares.¹⁻⁷ Por este motivo, se han venido realizando numerosos estudios sobre las propiedades estructurales, fotofísicas, etc., de una nueva familia de ciclodextrinas modificadas con grupos naftaleno. El grupo de A. Ueno⁸⁻¹⁰ fue uno de los pioneros en estudiar este tipo de sistemas, centrándose en el efecto que el macrociclo tenía en los cambios conformacionales. Los sistemas de estudio fueron ciclodextrinas modificada con dos grupos 2-naftilacetilo unidos en la cara primaria. Observaron mediante técnicas de dicroísmo circular y fluorescencia, que en presencia de moléculas huésped, cuando se trataba de β CD, se producía un equilibrio conformacional entre una forma donde solo uno de los dos grupos naftaleno se encontraba incluido, y otra, donde los dos naftalenos se situaban fuera, a modo de tapadera. Ésta última conformación, era más abundante a medida que aumentaba la concentración de huésped. Cuando la ciclodextrina modificada era del tipo γ CD, se producía la autoinclusión de los dos cromóforos naftaleno de forma simultánea en el interior, aunque al igual que en el caso anterior en presencia de moléculas huésped, los dos cromóforos se disponen hacia fuera a modo de tapadera.⁹ B. Valeur y sus colaboradores,¹¹⁻¹³ han estudiado las propiedades fotofísicas de la β CD modificada con varios grupos 2-naftiloxi sustituidos en una o en las dos caras como modelos para estudiar la transferencia de energía entre los diferente naftalenos y sus aplicaciones como antenas moleculares. Garcia-Garibay y McAlpine^{3,14,15} han descrito la síntesis y los cambios conformacionales de la 3-O-(2-metilnaftil)- β CD, donde, además del movimiento del cromóforo *dentro* \rightleftharpoons *fuera* con respecto a la ciclodextrina, se observan procesos de asociación del tipo *monómero* \rightleftharpoons *dímero*. La variación del desplazamiento químico en los espectros de RMN con la concentración, indicaron una constante en el equilibrio *monómero* \rightleftharpoons *dímero* de $5000 \pm 500 \text{ M}^{-1}$ a 25°C .³ De forma análoga a lo que sucedía con otros cromóforos descritos en el capítulo anterior, la longitud, la posición y el tipo de sustituyentes que unen el grupo naftaleno a la ciclodextrina también van a afectar al comportamiento de todo el sistema.^{4,5} Por ejemplo, la 6-O-mono-2-naftoato- β CD posee el grupo 2-naftoil directamente unido a la ciclodextrina en la cara primaria y se observa que tiende a formar dímeros; mientras que en la 6-[(N-2-naftoil-2-aminoetil)amino]-6deoxi-

β CD, el grupo cromóforo se une a la ciclodextrina por una cadena relativamente más larga y prefiere autoincluirse.^{4,5} Se ha observado, comparando la misma ciclodextrina sustituida en la misma posición del macrociclo y por el mismo cromóforo, comportamientos diferentes si el naftaleno está unido en la posición 1 o en la 2. Por ejemplo, derivados de la amino- β CD con un grupo naftaleno unido a la ciclodextrina mediante un grupo amida, revelaron que si la sustitución se realiza en la posición 1 del naftaleno, presenta una excelente respuesta fluorescente cuando se compleja con diferentes tipos de alcoholes; en cambio, si la sustitución es en la posición 2, no se observa apenas cambio en la fluorescencia con la inclusión de esos mismos alcoholes.¹⁶

El grupo de J. W. Park ha trabajado en la síntesis de ciclodextrinas modificadas con varios tipos cromóforos en la cara primaria,^{2,7,17-19} destacando la 6-*O*-(2-sulfonato-6-naftil)- β CD y γ CD. Estas ciclodextrinas forman dímeros de tipo cabeza-cabeza (HH) aunque con constantes de dimerización muy diferentes, siendo $9700 \pm 2500 \text{ M}^{-1}$ y $140 \pm 50 \text{ M}^{-1}$ a 25°C para el caso del tipo β CD¹⁸ y γ CD,² respectivamente. Y. Liu y sus colaboradores²⁰ han publicado la síntesis de β CDs permetiladas modificadas en su cara primaria con un derivado del naftaleno y de la quinoleína. Los resultados obtenidos por dicroísmo circular y ROESY demuestran que ambos cromóforos están autoincluidos dentro de la cavidad de la ciclodextrina, pero son movidos hacia fuera cuando se compleja con compuestos derivados de las sales biliares.

Todos los sistemas mencionados anteriormente disponen el cromóforo derivado del naftaleno unido a una única posición de una glucopiranososa de la ciclodextrina, mayoritariamente situada en la cara primaria. Es importante destacar que aunque los ejemplos de derivados de naftaleno unidos a β CD son muy numerosos, los ejemplos con γ CD son realmente escasos y, a día de hoy, no conocemos ningún estudio para derivados de la α CD.

Los grupos de los Profs. Ortiz Mellet y García Fernández también han sintetizado α -, β - y γ -ciclodextrinas permetiladas sustituidas con un grupo cromóforo naftaleno, de forma parecida al grupo de xilileno, en las posiciones 2 y 3 de la cara secundaria de la misma unidad de glucopiranososa. El grupo naftaleno tiene mayor volumen y mayor superficie hidrofóbica, con lo que seguramente los equilibrios conformacionales que implican al cromóforo (*tapadera* \rightleftharpoons *abierta*) y a la ciclodextrina (*dímero* \rightleftharpoons *monómero*) presentes en los derivados de xilileno de las α -, β - y γ -ciclodextrinas permetiladas estudiados en el Capítulo 8, se verán alterados substancialmente. Pero además, como

indicamos anteriormente la “a priori” mayor eficiencia cuántica de fluorescencia y la alta absorptividad molar del grupo naftaleno comparado con el xilileno, van a permitirnos cuantificar esos procesos de manera más efectiva por las técnicas de fluorescencia y dicroísmo circular. Así pues, en este capítulo se van a utilizar técnicas de fluorescencia, dicroísmo circular y Mecánica y Dinámica Molecular para estudiar el comportamiento en disolución de ciclodextrinas derivadas del naftaleno 2¹,3¹-*O*-(1,8-naftaleno)-per-*O*-Me- α -, - β - y γ -CDs (*Nm* α CD, *Nm* β CD²¹ y *Nm* γ CD, respectivamente), donde el grupo cromóforo se encuentra unido en las posiciones 2 y 3 de una misma unidad de gluocopiranosita situada en la cara secundaria. Se van a obtener constantes de dimerización, parámetros termodinámicos de proceso de asociación e información sobre las conformaciones que esta CD modificada puede adoptar en disolución acuosa y en diferentes disolventes de distinta polaridad. La termodinámica de complejación del cromóforo modelo aislado (oNy) con las CDs permetiladas (*m*CD) y la heteroasociación de *Nm*CD con sus homólogas *m*CDs también van a ser estudiadas.

En estudios previos de RMN sobre la *Nm* β CD²¹ se observó en el espectro de ¹H RMN en agua deuterada a 25°C, que el cromóforo se encontraba situado relativamente cerca de la cara secundaria de la ciclodextrina. Además, no se mostraba ninguna variación significativa del desplazamiento químico del protón con la temperatura (5°-50°C) y con la concentración (1.42-22mM), indicando que había mayoritariamente una especie en estas condiciones. La presencia de picos cruzados en el espectro de NOESY (Figura 9.1) entre los protones del grupo aromático y de los grupos metoxi de la cara secundaria de la ciclodextrina, indicaba que éstos se encontraban situados próximos en el espacio, lo que estaría de acuerdo con la presencia de asociaciones en forma de dímeros del tipo cabeza-cabeza (HH).

Al igual que sus análogas con xilileno, este tipo de ciclodextrinas también presentan solubilidades negativas. Se ha observado que a temperaturas superiores a 50°-60°C (dependiendo de la concentración) aparece un ensanchamiento del espectro de RMN, lo que seguramente indica la presencia de la especie monomérica (más insoluble que el dímero) cuya contribución aumentaría con la temperatura. Estos resultados apoyarían que el proceso de asociación está caracterizado por una $\Delta H^0 < 0$.

La forma del espectro de ¹H RMN en cloroformo deuterado (1.5mM a 25°C) difiere totalmente del observado en D₂O e indica que el anillo de naftaleno se encuentra mucho más alejado de la cavidad de la ciclodextrina y expuesto al disolvente. Este espectro

tampoco cambia al variar la temperatura o la concentración y no se observa la presencia de ningún precipitado.

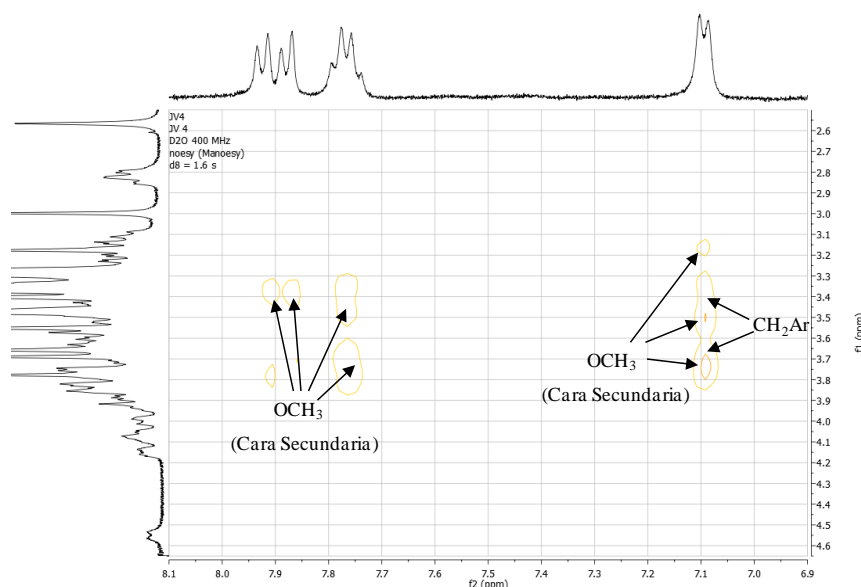


Figura 9.1. Ampliación del espectro de 2D NOESY (400MHz, D₂O, 298K) de NmβCD donde se muestra la intersección entre los protones del grupo aromático y de los grupos -OCH₃ de la cara secundaria.

Además, se evaluó la capacidad del NmβCD a concentraciones donde existe mayoritariamente en forma de dímero, para formar complejos de inclusión con derivados del adamantano: el carboxilato-1-adamantano (AC) y amina-1-adamantano (AA). Los resultados de RMN mostraron que con la adición de cualquiera de las especies de adamantano (hasta más de 10 veces concentración de adamantano que de NmβCD) no se producía ninguna variación en el desplazamiento químico del NmβCD, lo que indicaría que la complejación con estas especies no se produce. Estos datos difieren de los obtenidos con XmβCD y con mβCD, que forman complejos de estequiometría 1:1 con AC con unas constantes de $443 \pm 2 \text{ M}^{-1}$ y $965 \pm 15 \text{ M}^{-1}$ a 25°C, respectivamente.²² Esto demuestra la existencia de agregados (dímeros) muy estables de NmβCD y cuyo acceso a la cavidad estaría impedido.

9.2 Resultados y discusión

Espectro de absorción

Los espectros de absorción para NmCDs presentan dos bandas intensas cuyos máximos se encuentran situados a 220 nm y 290 nm, y una banda mucho más débil a

320 nm. En la Figura 9.2 se muestra el espectro de absorción para una disolución de $Nm\beta CD$ en agua (para $Nm\alpha CD$ y $Nm\gamma CD$ los espectros son análogos). Las disoluciones de cualquiera de las $NmCDs$ en agua presentan espectros de absorción similares al observado para el compuesto modelo del cromóforo aislado oNy, aunque el máximo se encuentra ligeramente desplazado hacia el azul alrededor de 5 nm.

Por comparación del espectro de absorción con compuestos similares derivados del naftaleno,²³ las bandas centradas a 220, 290 y 320 nm se pueden asignar a las transiciones electrónicas 1B_b , 1L_a y 1L_b (según la notación de Platt²⁴), respectivamente. Las orientaciones de los momentos de la transición para cada una de estas transiciones electrónicas se representan en el esquema superpuesto de la Figura 9.2 y prácticamente son paralelos al eje mayor (1B_b) y al eje menor del grupo naftaleno (1L_a y 1L_b).

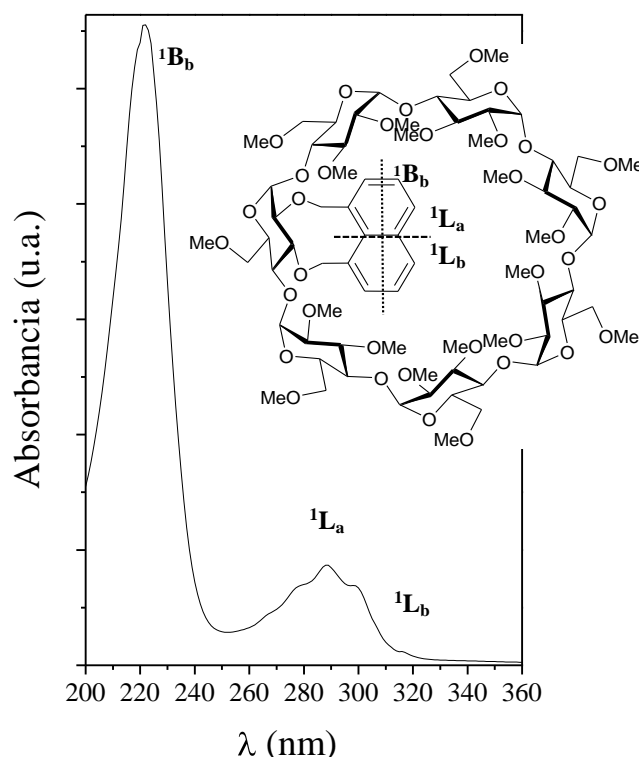


Figura 9.2. Espectro de absorción de $Nm\beta CD$ en agua a 25°C. Superpuesta, la estructura de la $Nm\beta CD$ mostrando las direcciones de los momentos de las diferentes transiciones electrónicas.

Espectros de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión se obtuvieron excitando el grupo naftaleno a 295 nm. Como muestra la Figura 9.3, cada espectro presenta una doble banda con máximos localizados a ~335 y ~342 nm y un hombro a ~355 nm. La intensidad de fluorescencia

aumenta conforme aumenta la concentración de NmCD, mientras que la relación entre las intensidades de las diferentes bandas apenas varía. Estos resultados, sumados al hecho de que no se observa ningún ensanchamiento de la banda de emisión hacia el rojo, demuestran la ausencia de excímeros intermoleculares entre los naftalenos de las NmCD para cualquiera que fuera la concentración y temperatura.

La representación de la intensidad de fluorescencia corregida, teniendo en cuenta el efecto interno, frente a la concentración inicial de NmCD, $[NmCD]_0$, a 25°C muestra una línea recta para todo el intervalo de concentraciones usado y para los tres tipos de NmCDs (superpuestas en la Figura 9.3), lo mismo que sucedía con las CDs modificadas con grupos xilileno estudiadas anteriormente. Este hecho está de acuerdo con $\phi_{(NmCD)_2} \approx \phi_{NmCD}$, es decir, que el rendimiento cuántico de fluorescencia no cambia durante el proceso de dimerización.

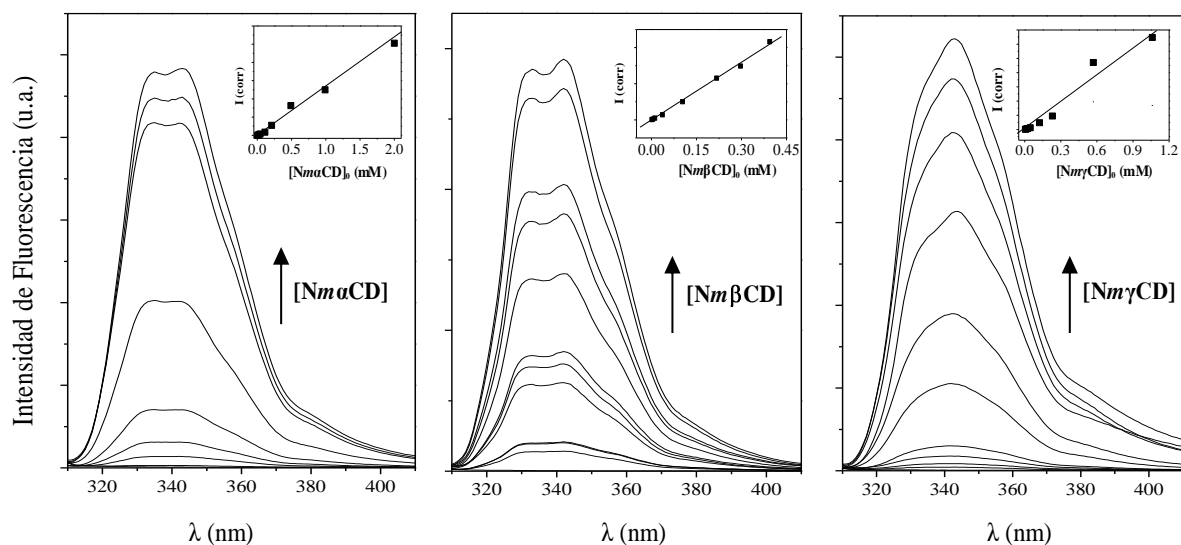


Figura 9.3. Espectros de emisión a varias $[NmCD]_0$. Superpuestas, las representaciones de la intensidad de emisión corregida en función de $[NmCD]$. NmαCD (izquierda), NmβCD (centro) y NmγCD (derecha) en agua a 25°C.

Decaimiento de tiempo de vida de fluorescencia

Las medidas de decaimiento de tiempo de vida a diferentes concentraciones y temperaturas fueron realizadas recogiendo en el máximo de la banda de emisión (342 nm) y excitando el cromóforo naftilo a 295 nm. Al igual que para los derivados de

ciclodextrina con grupos xilileno, los perfiles de decaimiento de fluorescencia fueron ajustados a tres exponenciales para todas las concentraciones y temperaturas. La componente de vida corta (~ 0.2 ns) es debida a la dispersión de luz originada. Las componentes del tiempo de vida intermedio (~ 12 ns) y más lento (~ 30 ns) se atribuyeron a las especies monomérica, $NmCD$, y dimérica, $(NmCD)_2$, respectivamente.

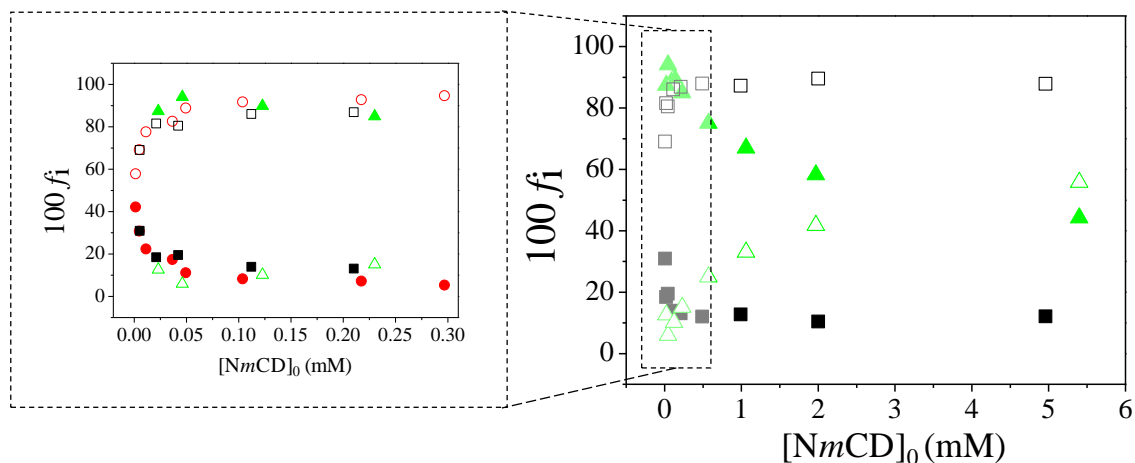


Figura 9.4. Variación en las fracciones de dímero y monómero con la $[NmCD]_0$: $Nm\alpha CD$ (□), $Nm\beta CD$ (○) y $Nm\gamma CD$ (△). Símbolos rellenos representan la f_{NmCD} y los huecos $f_{(NmCD)_2}$.

Como muestra la Figura 9.4, de forma general para las tres $NmCD$ s, la fracción de la componente intermedia correspondiente al monómero, f_{NmCD} , disminuye a medida que aumenta la concentración de $NmCD$, mientras que la componente dimérica, $f_{(NmCD)_2}$, aumenta con $[NmCD]$. Las diferentes tendencias en las gráficas son seguramente debidas a los diferentes valores de las constantes de dimerización, K_D . Para la $Nm\alpha CD$ y $Nm\beta CD$, K_D deben ser muy grandes, ya que prácticamente el 100% de la fracción de dímero se alcanza a muy bajas concentraciones de $[NmCD]$ (>0.10 mM), de manera que incluso a la concentración más baja medida, la fracción de dímero es superior a la del monómero. Por el contrario, en caso de la $Nm\gamma CD$, a bajas concentraciones la fracción de monómero es superior a la de dímero y apenas varían en el intervalo $[Nm\gamma CD]=0-0.30$ mM. No obstante, a mayores concentraciones en el intervalo de 0-6mM se produce la disminución de f_{NmCD} y el aumento de $f_{(NmCD)_2}$ de forma mucho más progresiva y haciendo incluso que a las concentraciones más altas medidas, la fracción del dímero apenas llegue a 0.5. Con seguridad, todo esto será consecuencia de una K_D mucho menor para la $Nm\gamma CD$ que para las otras dos $NmCD$ s.

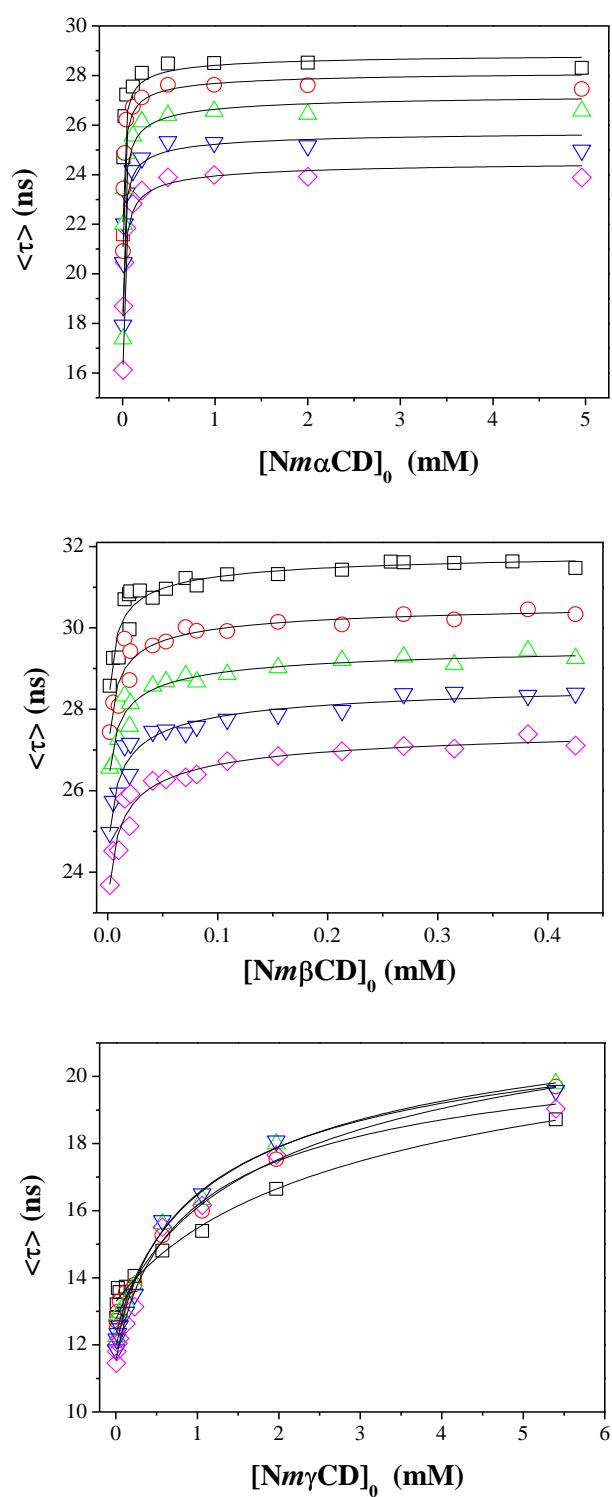


Figura 9.5. Variación del promedio del tiempo vida $\langle \tau \rangle$ en función $[NmCD]_0$, para las disoluciones acuosas de $Nm\alpha CD$ (*superior*), $Nm\beta CD$ (*medio*) y $Nm\gamma CD$ (*inferior*) a diferentes temperaturas 5 °C (\square); 15 °C (\circ); 25 °C (\triangle); 35 °C (∇); 45 °C (\diamond).

Tabla 9.1. Constantes de asociación K_D , τ_{NmCD} y $\tau_{(NmCD)_2}$ obtenidas mediante el análisis de decaimiento de fluorescencia a diferentes $[NmCD]_0$ y temperaturas.

Nm α CD

T(°C)	$10^{-3} \times K_D(M^{-1})$	τ_{XmCD} (ns)	$\tau_{(XmCD)_2}$ (ns)
5	736 ± 282	6 ± 37	29 ± 0.4
15	684 ± 174	5 ± 24	28.2 ± 0.3
25	776 ± 305	3 ± 52	27.4 ± 0.6
35	512 ± 920	3.9 ± 16.0	25.9 ± 0.3
45	423 ± 625	2.4 ± 13	24.7 ± 0.3

Nm β CD

T(°C)	$10^{-3} \times K_D(M^{-1})$	τ_{XmCD} (ns)	$\tau_{(XmCD)_2}$ (ns)
5	216 ± 202	26.5 ± 1.6	32.4 ± 0.2
15	137 ± 127	26.1 ± 1.2	30.8 ± 0.2
25	92 ± 58	25.5 ± 0.6	29.8 ± 0.2
35	78 ± 44	24.0 ± 0.6	28.9 ± 0.2
45	69 ± 34	22.8 ± 0.6	27.8 ± 0.2

Nm γ CD

T(°C)	$K_D(M^{-1})$	τ_{XmCD} (ns)	$\tau_{(XmCD)_2}$ (ns)
5	135 ± 42	13.2 ± 0.1	25.4 ± 1.8
15	239 ± 45	12.6 ± 0.1	25.5 ± 0.9
25	401 ± 84	12.3 ± 0.1	24.4 ± 0.8
35	508 ± 92	12.0 ± 0.1	23.8 ± 0.7
45	579 ± 128	11.5 ± 0.1	22.9 ± 0.7

Estudio termodinámico del proceso de dimerización

La variación del promedio de tiempo de vida ($\langle\tau\rangle$) en función de la $[NmCD]$ y el ajuste obtenido mediante la Ecuación 8.8 (Capítulo 8), permitió obtener las constantes de dimerización. Del mismo modo que para el caso de la XmCDs, en el cálculo de $\langle\tau\rangle$ no se tuvo en cuenta la componente rápida debida a la dispersión de luz y como se demostró anteriormente a través de los espectros de emisión, $\phi_{(NmCD)_2} \approx \phi_{NmCD}$ por lo que $\phi_{(NmCD)_2}/\phi_{NmCD} = 1$ para todos los ajustes de la Ecuación 8.8.

En la Figura 9.5 se indica cómo para todas las $NmCD$ s, $\langle\tau\rangle$ aumenta con la $[NmCD]$, debido al incremento en la proporción de dímero que tiene un mayor tiempo de vida. Sin embargo, mientras que para la $Nm\alpha CD$ y $Nm\beta CD$ se alcanza un valor constante de $\langle\tau\rangle$ a relativas bajas concentraciones, para $Nm\gamma CD$ se observa una curva mucho menos pronunciada, indicando que la K_D va a ser mucho más baja para este sistema, como señalamos anteriormente. La Tabla 9.1 recoge los constantes de dimerización y el valor de τ_{NmCD} y $\tau_{(NmCD)_2}$ para los diferentes tipos de $NmCD$ s.

También se obtuvieron los parámetros termodinámicos, ΔH^0 y ΔS^0 a partir de las representaciones lineales de van't Hoff (Figura 9.6). Dichos parámetros se encuentran recogidos en la Tabla 9.2.

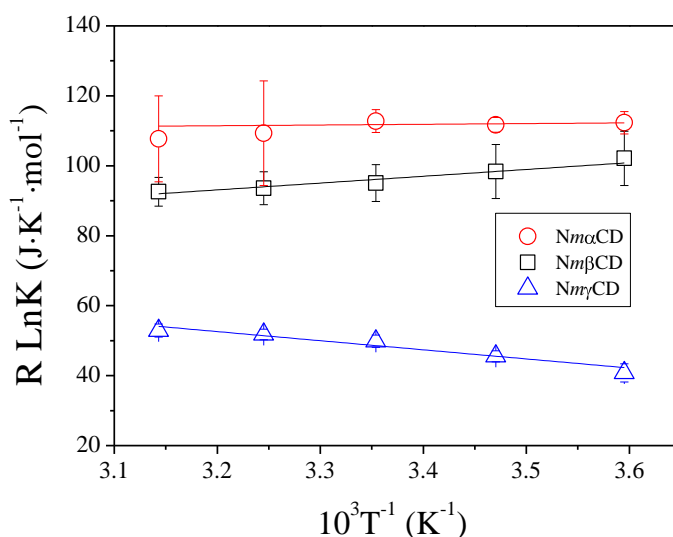


Figura 9.6. Representaciones de van't Hoff obtenidas a partir las K_D recogidas en la Tabla 9.1 para $Nm\alpha CD$ (\circ), $Nm\beta CD$ (\square) y $Nm\gamma CD$ (\triangle).

A pesar de los errores que acompañan a los valores de K_D , las gráficas son lineales en todo el intervalo de temperaturas empleado. Los valores de ΔH^0 indican que los procesos de dimerización para $Nm\alpha CD$ y $Nm\beta CD$, respaldando los datos obtenidos por RMN, son exotérmicos y muy similares a los obtenidos para sus equivalentes $XmCD$ s.^{22,25} Valores de entalpía negativos son típicos de especies hidrofóbicas cuyos procesos de asociación están favorecidos por fuerzas atractivas tipo van der Waals.²⁶ Por el contrario, la dimerización de $Nm\gamma CD$ es endotérmica, siendo consecuencia probablemente del fuerte debilitamiento de esas interacciones atractivas debido al

aumento del tamaño y flexibilidad del macrociclo.^{27,28} Por otro lado, los tres tipos de *Nm*CDs están caracterizados por valores de entropía positivos, al contrario que para sus homólogas *Xm*CDs, cuya variación era negativa. El gran tamaño del grupo naftaleno y su alto carácter hidrofóbico probablemente hace que la contribución de entropía debida a la ruptura de las capas de hidratación que rodea al naftaleno cuando se produce la dimerización, sea mucho mayor que en el caso del grupo xilileno de las *Xm*CDs,^{25,29} haciendo que las ΔS^0 sean favorables para todos los procesos de dimerización.

Tabla 9.2. ΔH^0 y ΔS^0 del proceso de dimerización para sistemas *Nm*CD/agua.

Sistema	ΔH^0 (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^0 (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
<i>Nm</i>αCD	-10.1 ± 3.9	+77 ± 13
<i>Nm</i>βCD	-21.3 ± 2.7	+25 ± 9
<i>Nm</i>γCD	+27.0 ± 3.6	+139 ± 12

Anisotropía

Se realizaron estudios de anisotropía variando la [*Nm*CD] y la temperatura. De forma general para los tres tipos de *Nm*CDs, a las concentraciones más bajas (< ~0.1 mM) la anisotropía disminuye de forma muy pronunciada a medida que la concentración aumenta. Es importante señalar que en este intervalo de concentraciones tan bajo, las muestras poseen un alto grado de dispersión de luz. Sin embargo, por encima de estas concentraciones se observa la conducta esperada, es decir, un aumento (disminución) de *r* con la concentración (temperatura). Estos resultados estarían de acuerdo con un aumento (disminución) en la formación de la especie dímero con la concentración (temperatura), cuya difusión rotacional es menor que la del monómero. No obstante, debido al uso de cubetas cilíndricas y a que las concentraciones usadas para los experimentos son relativamente bajas, cualquier conclusión obtenida del análisis de estas medidas no es demasiado fiable, como sucedía en el estudio de sus homólogas *Xm*CDs.

Desactivación de fluorescencia

Como consecuencia de la gran diferencia de K_D entre los tres tipos de *Nm*CDs, los experimentos de desactivación de fluorescencia tuvieron que realizarse utilizando la misma concentración. Sin embargo, para obtener una mayor información sobre la

accesibilidad del cromóforo y por tanto sobre la estructura de los dímeros formados, decidimos hacer medidas a dos concentraciones bien diferenciadas: $\sim 0.26 \times 10^{-2}$ y ~ 0.26 mM. Las fracciones de NmCD en forma de dímero para las disoluciones acuosas de Nm α CD, Nm β CD y Nm γ CD de concentraciones $\sim 0.26 \times 10^{-2}$ mM (~ 0.26 mM), son respectivamente: 0.32 (0.87), 0.15 (0.76) y ~ 0 (0.08). Las representaciones de Stern-Volmer $\langle \tau \rangle_{q=0} / \langle \tau \rangle$ son lineales en todo el intervalo de concentración del diacetilo (0-0.1 M), utilizado como quencher o desactivador.

Tabla 9.3. Constantes bimoleculares de desactivación (k_q) para Nm α CD, Nm β CD, Nm γ CD y oNy en agua a 25°C.

$k_q \times 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ Sistema	Nm α CD	Nm β CD	Nm γ CD	oNy
[NmCD] ~ 0.26 mM	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.48 ± 0.03	3.0 ± 0.2
[NmCD] $\sim 0.26 \times 10^{-2}$ mM	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.5	2.4 ± 0.2	

La constante bimolecular, k_q , a 25°C para el compuesto modelo oNy y las NmCDs a las dos concentraciones de estudio aparecen en la Tabla 9.3. Como era de esperar, la mayor constante bimolecular se muestra para el cromóforo libre (oNy). Los resultados para todas las NmCDs a ambas concentraciones muestran una accesibilidad del desactivador mucho menor al grupo oNy, lo que sugiere que el cromóforo se encuentra mucho menos accesible cuando está formando parte del dímero que en su forma libre. Este hecho seguramente es debido a que los cromóforos se encuentran situados y apantallados entre las dos ciclodextrinas (del tipo HH) o que, al menos uno de ellos, se localiza cerca de la cavidad de la ciclodextrina vecina (tipo HT). No obstante, Nm γ CD posee una k_q bastante mayor indicando que el cromóforo Ny se dispone de forma mucho más accesible al medio a cualquiera de las dos concentraciones. Esto se debe seguramente a las diferencias en las K_D , ya que para la misma concentración, existe una mayor fracción de monómero Nm γ CD (en el monómero el cromóforo Ny se encuentra mucho más accesible que en el dímero) que en el caso de Nm α CD o de Nm β CD. Sin embargo, si comparamos el valor de k_q para el oNy y el de la Nm γ CD a la menor concentración, donde prácticamente no existe dímero, los resultados parecen indicar que incluso el grupo Ny de la especie monomérica de las NmCDs es menos accesible que en el oNy libre.

Como también era de esperar, para la misma $NmCD$, k_q disminuye con la fracción de dímero formado. Además la relación entre k_q a altas y bajas concentraciones sigue esta tendencia de K_D , indicando que la variación de k_q con la concentración es mucho más grande para $Nm\alpha CD$ y $Nm\beta CD$ (~16 veces mayor entre las dos concentraciones) que para $Nm\gamma CD$ (solo ~5 veces más).

Dependencia del rendimiento cuántico y del tiempo de vida con la polaridad del medio (ϵ) y la microviscosidad (η)

De modo similar a como hicimos con las $XmCDs$ modificadas con xilileno, para explicar los cambios que tienen lugar en los rendimientos cuánticos (ϕ) y tiempos de vida de fluorescencia (τ) durante la asociación, hemos analizado la influencia que tienen la polaridad (ϵ) y la microviscosidad (η) del medio que rodea al grupo cromóforo naftilo (Ny) de las $NmCDs$ sobre los parámetros ϕ y τ . Para ello, estudiamos las características fluorescentes del compuesto modelo aislado, oNy , en diferentes disolventes (agua, diferentes n -alcoholes y mezclas de n -alcoholes) a 25°C. Los resultados, representados en la Figura 9.7, muestran una ligera disminución del tiempo de vida τ (correspondiente a un perfil de decaimiento monoexponencial) con ϵ , para $\epsilon > 50$, y un aumento con η . Por el contrario, apenas se observa para el rendimiento cuántico, ϕ , ninguna tendencia especial al cambiar las propiedades del medio ($\phi = 0.08 \pm 0.06$) como sucedía con el grupo xilileno.

La formación de dímeros físicamente debe implicar una disminución en la polaridad del medio, desde prácticamente el valor para el agua ($\epsilon \approx 78$) hasta un medio no demasiado apolar (probablemente $\epsilon \geq 50$), y un aumento aparente de la microviscosidad que rodea al cromóforo, lo que estaría de acuerdo con $\phi_{(NmCD)_2} \approx \phi_{NmCD}$ ($\phi_{(NmCD)_2} / \phi_{NmCD} \approx 1$) y con $\tau_{(NmCD)_2} > \tau_{NmCD}$ y por tanto, el aumento de $\langle \tau \rangle$ observado durante la dimerización.

Por otro lado, también se obtuvieron los promedios del tiempo de vida $\langle \tau \rangle$ a 25°C para cada una de las disoluciones acuosas de $Nm\alpha$ -, $Nm\beta$ - y $Nm\gamma CD$ s con la misma concentración (~ 0.2 mM), donde las fracciones de dímero eran respectivamente 0.85, 0.74 y 0.07, así como en diferentes disolventes a esa misma concentración y temperatura. La Figura 9.8 muestra una disminución de la relación de fracciones de dímero y monómero y del $\langle \tau \rangle$, al disminuir la polaridad del disolvente. Este resultado es consecuencia del desplazamiento del equilibrio y consiguiente disociación del $(NmCD)_2$ en la especie monomérica (especie cuyo tiempo de vida es menor), debido al

debilitamiento de las interacción hidrofóbicas entre CDs a medida que el medio se va haciendo menos polar. Cabe destacar que para $Nm\gamma$ CD, la variación de $\langle\tau\rangle$ y la relación dímero/monómero con la ϵ es muy pequeña. Debido al valor tan bajo de K_D , a la concentración usada la fracción de dímero en la disolución acuosa de $Nm\gamma$ CD apenas representa el 7%. Una disminución en la polaridad conlleva una ruptura del dímero y una disminución del $\langle\tau\rangle$, pero apenas perceptible por la gran cantidad de monómero presente en la disolución.

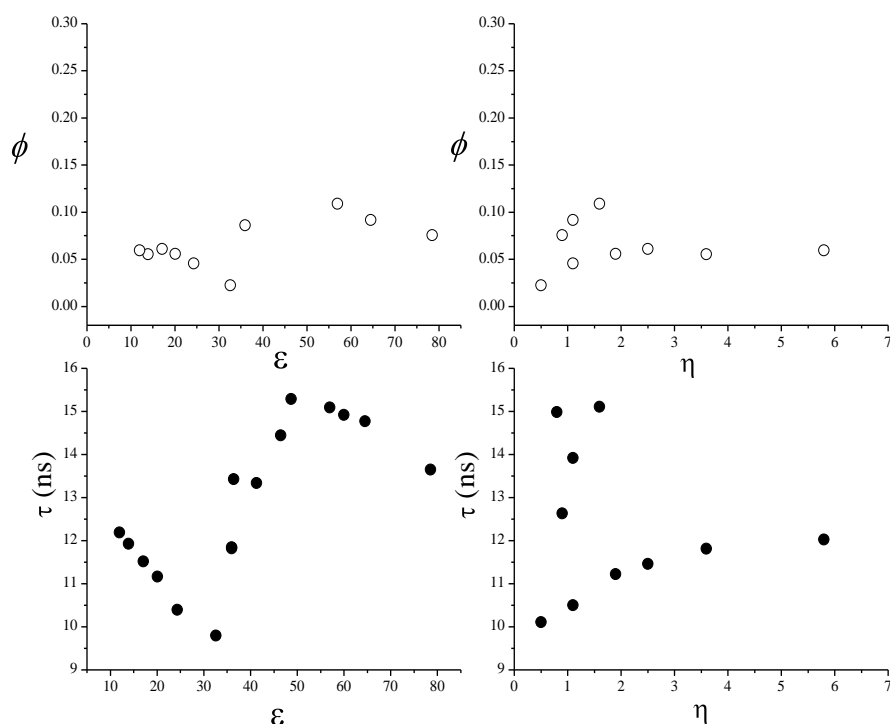


Figura 9.7. Variación del rendimiento cuántico (ϕ) y el tiempos de vida (τ) con la polaridad (ϵ) y microviscosidad (η) para oNy en agua, diferentes disolventes n-alcoholes (desde metanol a heptanol) y mezclas agua:alcohol a 25°C.

Por otro lado, es muy conocida la afinidad que tienen los derivados de adamantano por la cavidad de las β CD, siendo capaces de formar complejos de inclusión de estequiometría 1:1 de gran estabilidad ($K \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$) en disolución acuosa.^{30,31} Procesos como la autoinclusión de grupos unidos a la CD, la dimerización, que describimos en este y otros capítulos de la Memoria, o la complejación con otras moléculas huésped, pueden competir con esta fuerte complejación con adamantano.³²⁻³⁵ Así pues, la presencia de derivados de adamantano aporta información sobre la estabilidad de los dímeros formados, ya que ambos procesos compiten de manera directa. Para llevar a cabo el

experimento de competición, añadimos el derivado 1-adamantanocarboxilato de sodio (AC) a las disoluciones 0.2 mM de Nm β CD, hasta obtener una concentración de [AC] \approx 1.6 mM (8 veces superior a la [Nm β CD]). Los resultados representados en la Figura 9.8 muestran que la adición de este exceso de AC apenas produce cambios en $\langle\tau\rangle$, ni en la relación entre las fracciones de dímero y monómero para cualquiera de los disolventes utilizados.

Aunque la afinidad de los derivados de adamantano con las α - y γ CDs es menor que para la β CD,^{30,36,37} decidimos realizar el mismo experimento para comprobar si se producía algún cambio en las propiedades de fluorescencia de las Nm α -y Nm γ CDs. Además, aunque en el caso de la Nm α CD las K_D son altas, para Nm γ CD la dimerización es un proceso menos favorecido, pudiendo ser posible que se rompiera el dímero en presencia del derivado de adamantano. Seguimos el mismo protocolo que para la Nm β CD y al igual que en ésta, no se observó ningún cambio en el equilibrio en presencia de AC, sea cual sea el disolvente utilizado (Figura 9.8).

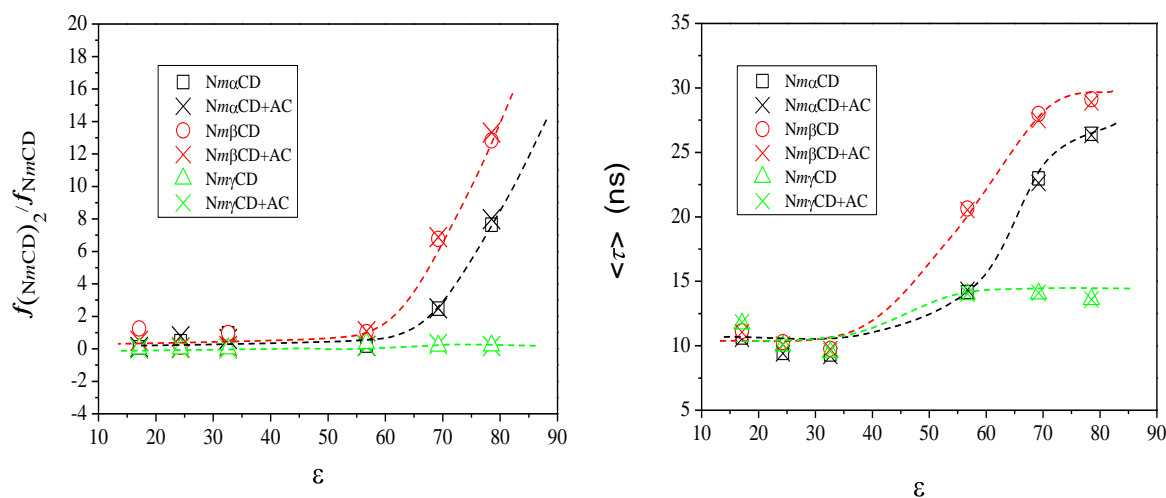


Figura 9.8. Cambios en la fracción de fluorescencia dímero-monómero (*izquierda*) y en el promedio del tiempo de vida (*derecha*) con la polaridad para disoluciones de NmCDs 0.2 mM a 25°C al medir en diferentes disolventes: agua, metanol:agua (20:80 y 50:50 v/v), etanol y butanol; Idem para la misma disolución añadiendo AC hasta alcanzar una concentración 1.6 mM.

Estudio de los procesos de heterodimerización y complejación

Para evaluar el papel del grupo Ny en la asociación intermolecular también se realizaron experimentos de heteroasociación de las NmCDs y su correspondientes mCDs, además de complejación del cromóforo aislado oNy con las diferentes m α -, m β - y m γ CD.

Los experimentos de heteroasociación de NmCD con mCD se llevaron a cabo manteniendo constante la concentración de NmCD (0.02 mM para las Nm α CD y Nm γ CD y 0.2 mM para Nm β CD) y variando [mCD] en el intervalo indicado en la Figuras 9.9 y 9.10.

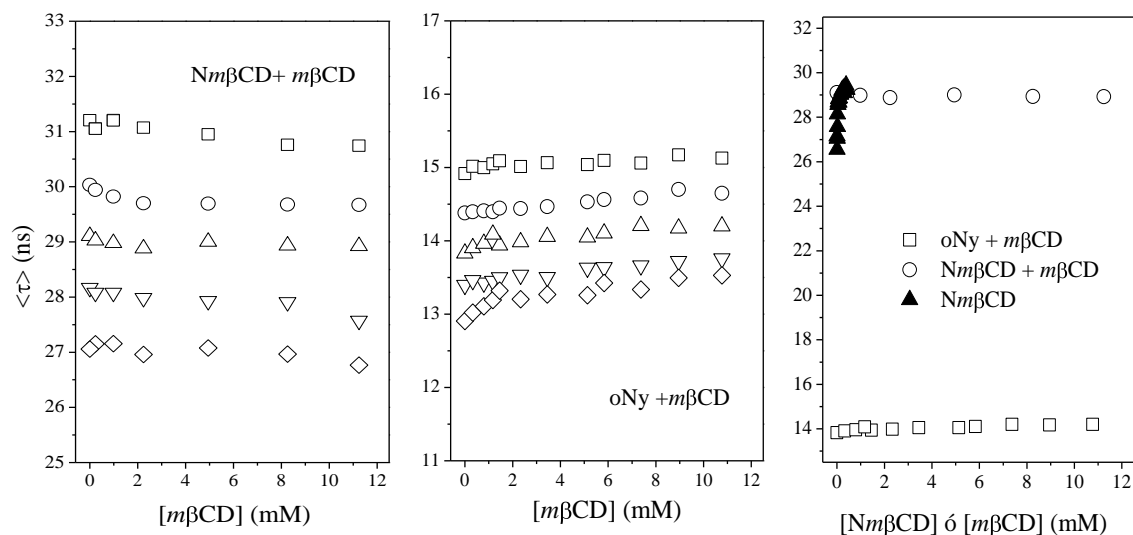


Figura 9.9. Variación del promedio de tiempo de vida $\langle \tau \rangle$ para una concentración fija de Nm β CD (izquierda) y oNy (medio) en función de la [m β CD] a diferentes temperaturas: 5 °C (\square); 15 °C (\circ); 25 °C (\triangle); 35 °C (∇); 45 °C (\diamond). Las concentraciones de Nm β CD (0.2 mM) y oNy (3×10^{-5} mM) se mantuvieron constantes en todos los experimentos. (Derecha) Estudio comparativo de $\langle \tau \rangle$ para diferentes sistemas a 25°C.

Para el sistema Nm β CD/m β CD, no se observa ningún cambio sustancial en los valores de $\langle \tau \rangle$ a cualquiera de las temperaturas estudiadas (Figura 9.9, izquierda). Esto es debido a que en la concentración de estudio del Nm β CD (0.2 mM), aproximadamente el 75% del Nm β CD se encuentra en forma de dímero e incluso la adición de un gran exceso de m β CD (más de 70 veces la concentración de Nm β CD) no fuerza la disociación de (Nm β CD) $_2$. El mismo comportamiento ocurre con la Nm α CD donde, a la concentración del experimento (0.02 mM), el 63% se dispone formando dímeros y el exceso de m α CD llega a alcanzar unas 400 veces (Figura 9.10, izquierda). Estos resultados refuerzan la idea de que los grupos naftilos son los responsables de la alta estabilidad de los dímeros y que seguramente la disposición de las ciclodextrinas sea cabeza-cabeza (HH), de igual forma que en las XmCDs.^{25,29} Por el contrario en el caso de la Nm γ CD, sí que se observa una disminución del tiempo de vida con la concentración de m γ CD (Figura 9.10, izquierda). El valor de K_D en este caso es mucho más pequeño que para las otras NmCDs,

y la fracción de dímero (a 0.02 mM) presente es muy baja ($\sim 1\%$). La variación del tiempo de vida observada es seguramente debida a la formación de heterodímeros en presencia de $m\gamma$ CD, que para este sistema, parecen formarse más fácilmente. Este hecho indicaría que posiblemente la estructura más estable podría ser del tipo cabeza-cola (HT) mejor que la cabeza-cabeza (HH). Es importante recordar que para la $Xm\gamma$ CD la estructura tipo HT era posible y justificaba algunos resultados experimentales, como los de desactivación de fluorescencia.²⁹

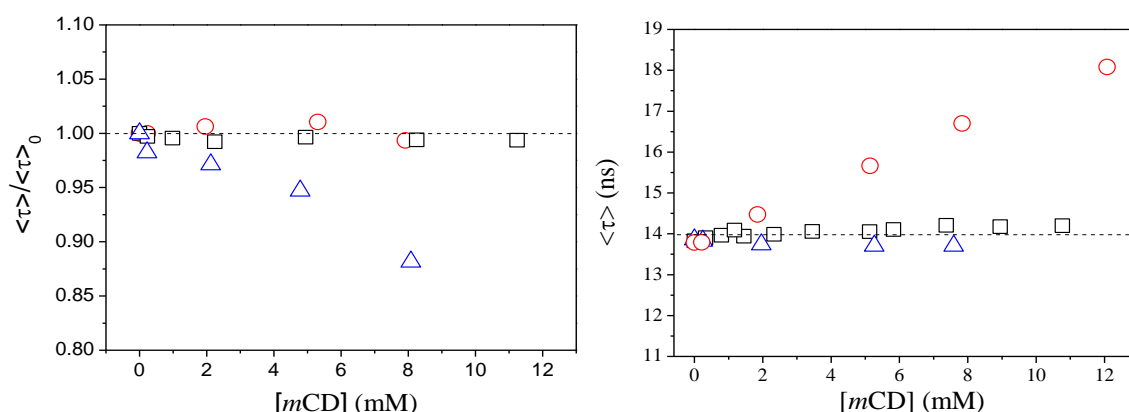


Figura 9.10. (Izquierda) Relación entre el promedio del tiempo de vida $\langle\tau\rangle/\langle\tau_0\rangle$ para una concentración fija de $[NmCD]$ ($[Nm\alpha CD]$ y $[Nm\gamma CD] \sim 0.02$ mM y $[Nm\beta CD] \sim 0.2$ mM) en función de la $[mCD]$ para $Nm\alpha CD/m\alpha CD$ (\circ), $Nm\beta CD/m\beta CD$ (\square) y $Nm\gamma CD/m\gamma CD$ (\triangle). (Derecha) Variación del $\langle\tau\rangle$ del cromóforo aislado oNy ($\sim 10^{-5}$ M, fija) añadiendo concentraciones variables de $m\alpha CD$ (\circ), $m\beta CD$ (\square) y $m\gamma CD$ (\triangle).

Para el estudio de la complejación de oNy con $m\beta$ CD y con $m\gamma$ CD, los experimentos demuestran que apenas se produce cambio apreciable en el tiempo de vida ni a altas concentraciones, ni variando de temperatura, por lo que probablemente no se complejan o si lo hacen, las constantes de complejación deben ser muy bajas. Solamente para $m\alpha$ CD, al igual que ocurría con $Xm\alpha$ CD,²⁵ se observa una variación del tiempo de vida apreciable, tal y como se muestra en la Figura 9.10 (derecha). Esto puede indicar que la $m\alpha$ CD tiene una cavidad óptima o dispone de interacciones favorables para la inclusión del oNy, lo que favorecería la dimerización de $Nm\alpha$ CDs, traduciéndose así en K_D bastante más alta que para el resto de Nm CDs. No obstante, aunque se vea favorecida la inclusión del cromóforo oNy, hay que tener presente que en la $Nm\alpha$ CD, el grupo Ny se encuentra unido al macroanillo por cadenas relativamente cortas a modo de bisagra. Por

ello, creemos que la asociación de dos $Nm\alpha$ CDs no implica la inclusión de los Ny en las cavidades vecinas, debido al fuerte impedimento estérico de los macrociclos al aproximarse.

Medidas de dicroísmo circular

Como se indicó anteriormente (Capítulo 4), la magnitud y el signo del espectro de dicroísmo circular de un grupo cromóforo unido a una ciclodextrina, nos aporta información sobre la localización de ese grupo con respecto a la ciclodextrina y, por tanto, sobre las posibles conformaciones que el sistema va a poder adoptar.

Para el caso de la $Nm\beta$ CD en disolución acuosa 0.2 mM, donde más del 70% de ciclodextrina se encuentra en forma de dímero $(Nm\beta CD)_2$ a 25°C, la señal de DC (Figura 9.11, *medio*, línea azul) presenta una señal intensa de doble signo en el intervalo de longitudes de onda de la transición 1B_b y una señal positiva pero débil en zona de la 1L_a . La banda de doble signo es típica del fenómeno del Acoplamiento Excitónico (AE) y tiene lugar cuando dos cromóforos, que presentan altos coeficientes de absorción molar, se encuentran próximos en el espacio. En el caso de la $Nm\alpha$ CD en disolución acuosa 0.2 mM (~85% de dímero formado a 25°C), la señal de AE no solamente aparece en la región 1B_b , sino también en la 1L_a indicando que los cromóforos Ny en el dímero formado se encuentran muy cercanos y que este sistema es muy estable en disolución. Estos resultados respaldarían que la disposición más favorable en agua para los dímeros $(Nm\beta CD)_2$ y $(Nm\alpha CD)_2$ sería tipo HH. Estos sistemas estarían fuertemente estabilizados preferentemente por interacciones cooperativas entre grupos naftilos, tal y como se había predicho para sus análogos $(Xm\beta CD)_2$ y $(Xm\alpha CD)_2$.²⁵

Por otro lado, estudiamos el efecto que tiene el medio en los cambios conformacionales y estructurales de las Nm CDs. Para ello, se midieron las señales de DC de las Nm CDs en distintos disolventes de diferente polaridad (la misma concentración y disolventes que los usados en el apartado *Dependencia del rendimiento cuántico y del tiempo de vida con la polaridad del medio (ϵ) y la microviscosidad (η)* Figura 9.8) y se observaron cambios drásticos en la señal de DC. En el caso de la $Nm\beta$ CD, mientras que la banda de la transición 1L_a decrece a medida que lo hace la polaridad del disolvente, la señal del AE disminuye desde la disolución en agua hasta la de metanol, y en disolventes de menor polaridad se produce una única banda de DC. Algo similar sucede en el caso de la $Nm\alpha$ CD para el AE de los dos intervalos de longitudes de onda de estudio. Esto estaría

de acuerdo con el hecho de que cuando el entorno de la $Nm\beta$ CD y $Nm\alpha$ CD se hace más y más hidrofóbico, la interacción entre los grupos naftilos se hace cada vez más débil, haciendo que el equilibrio se desplace hacia la especie monomérica. Conclusiones similares se obtuvieron mediante experimentos de fluorescencia, de manera que la cantidad de dímero formada aumentaba con la polaridad del medio (Figura 9.8). Además también respaldaría el hecho de que el proceso de dimerización de Nm CD en agua estuviese acompañado por $\Delta S^0 > 0$, donde el efecto hidrofóbico del grupo Ny en medio polar juega un papel fundamental.

En el caso de la $Nm\gamma$ CD, el porcentaje del dímero a las concentraciones empleadas es bastante bajo ($\sim 7\%$), aunque el hecho de que el espectro cambie con la polaridad del medio es sinónimo de que se está produciendo algún tipo de cambio estructural. La ausencia de AE y el signo negativo en ambas bandas, podría indicar una disposición del tipo HT. Según las reglas de Kodaka, ambas transiciones serían perpendiculares al eje del macrociclo, siempre y cuando el cromóforo estuviese dispuesto dentro del entorno de la cavidad de la ciclodextrina. Además, las bajas K_D obtenidas apoyarían el hecho de que este sistema no se estabilice por interacciones hidrofóbicas entre los grupos cromóforos, ya que la aproximación HT no facilitaría esta disposición. La formación de heterodímeros en presencia de $m\gamma$ CD también estaría de acuerdo. Como vimos anteriormente, en el caso de su análoga $Xm\gamma$ CD, la disposición HT también era favorable.²⁹

Es interesante resaltar que los tres tipos de sistemas presentan un espectro de dicroísmo circular bastante parecido en disolventes no polares: una banda positiva y relativamente intensa para la transición 1B_b y otra banda también positiva, pero bastante más débil, para la transición 1L_a . Estas señales estarían de acuerdo con la existencia de una especie monomérica donde el grupo naftaleno se encontrase interactuando con el macroanillo pero fuera y relativamente paralelo a la cavidad, de acuerdo con las reglas de Kodaka.^{23,38,39}

Al igual que para las medidas de fluorescencia, ninguna de las bandas del espectro de DC para las diferentes Nm CDs en cualquiera de los disolventes empleados se vieron afectadas por la adición de AC. Esto puede ser debido a que bien porque, cualquiera que sea la temperatura de medida (25° y 45°C), la complejación de AC con Nm CD en disolventes polares no puede competir con la fuerte dimerización; o bien, porque en disolventes hidrofóbicos no se forma ningún complejo, tal y como también se dedujo de las medidas de tiempos de vida de fluorescencia (Figura 9.8).

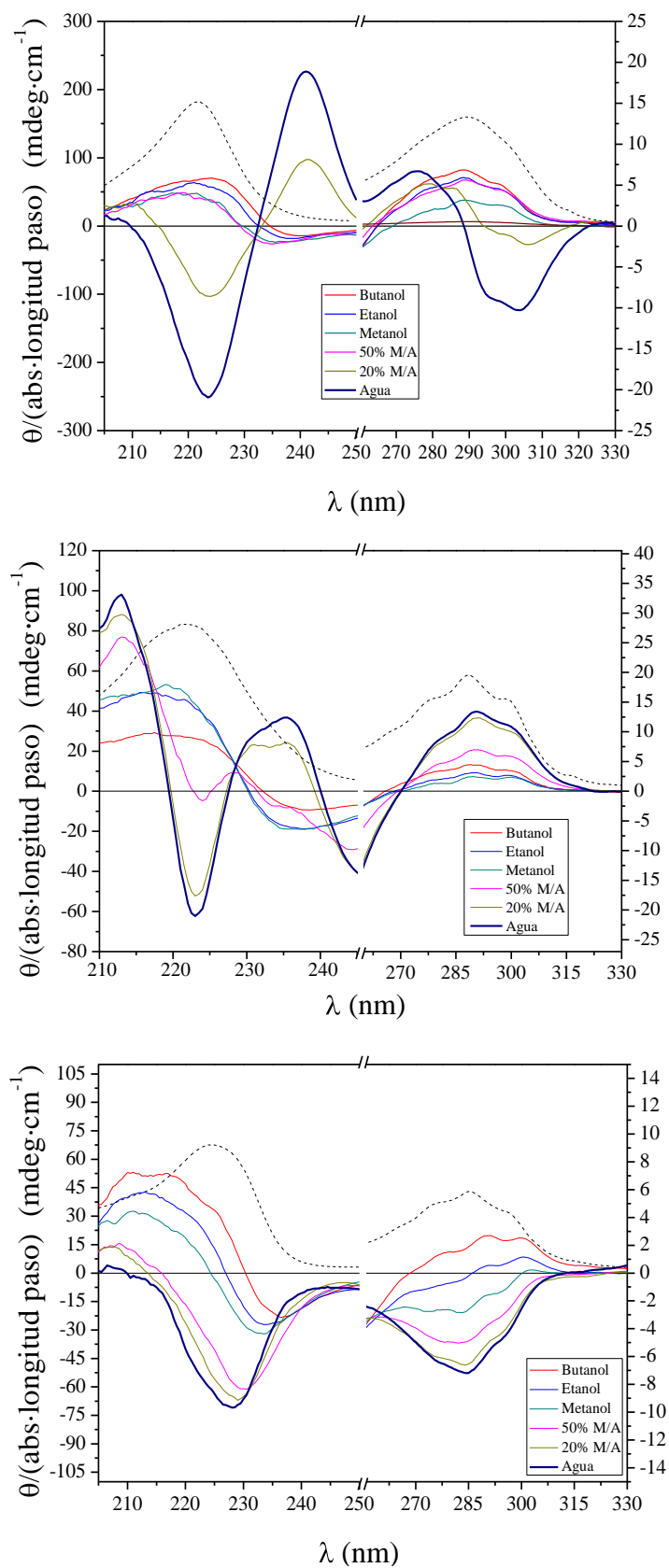


Figura 9.11. Espectro de absorción en agua (línea punteada) y de dicroísmo circular (líneas continuas) de $[NmCD] \approx 0.2$ mM de $Nm\alpha CD$ (*superior*), $Nm\beta CD$ (*medio*) y $Nm\gamma CD$ (*inferior*) para diferentes disolventes a 25°C.

Intentamos obtener la K_D a 25°C, a partir de la variación de la señal de la banda 1L_a de espectro de DC de Nm β CD/agua con la concentración. Desafortunadamente, debido al bajo coeficiente de absorción molar de esta banda, no se pudieron obtener señales de DC fiables a concentraciones inferiores a 0.25 mM y obtener así los suficientes datos como para calcular la constante de dimerización. Para concentraciones de Nm β CD superiores a 0.25 mM, la intensidad de DC varía muy poco debido a que a estas concentraciones prácticamente el 100% del Nm β CD se encuentra complejado y el plateau de la curva casi se ha alcanzado (Figura 9.5 *medio*). No obstante, los datos experimentales obtenidos se ajustan de forma razonada a la Ecuación 8.8 usando como K_D el valor obtenido previamente por medidas de fluorescencia a 25°C.

Estudios teóricos: Mecánica y Dinámica Molecular

Comportamiento conformacional del monómero NmCD

Hemos realizado simulaciones de Dinámica Molecular (DM) de 10 ns en el vacío a diferentes temperaturas sobre las 10 conformaciones más estables para la Nm β CD (Figura 9.12). En estas 10 conformaciones el sustituyente naftaleno (Ny) se puede encontrar en dos tipos de disposiciones: una “*abierta*” y otra “*totalmente abierta*” (para más detalles sobre la obtención de estas conformaciones remitirse al Capítulo 5). Del análisis de estas trayectorias se obtuvieron las distribuciones de probabilidades para los ángulos de torsión ϕ_i y ψ_i , donde se observa, como es habitual en las CDs, que dichos ángulos tienden a adoptar conformaciones próximas al estado *trans* de $0\pm 60^\circ$, aunque ψ_i puede visitar esporádicamente el estado *cis* (180°), responsable de la distorsión del macrociclo.⁴⁰ A cualquier temperatura, el anillo de Nm β CD es mucho menos flexible que su homólogo Xm β CD debido al mayor tamaño del sustituyente. Esto hace que las distribuciones de los ángulos apenas se ensanchen con la temperatura. Por otra parte, aunque los ángulos que describen la rotación alrededor del enlace éter que une el grupo naftilo al macroanillo de CD cambian durante la trayectoria, esta variación no origina cambios importantes en las conformaciones *abierta* y *totalmente abierta* de la Nm β CD de partida. Es decir, la apertura o cierre del cromóforo no va a depender apenas de estos ángulos, sino más bien del ángulo ψ_i del macrociclo.

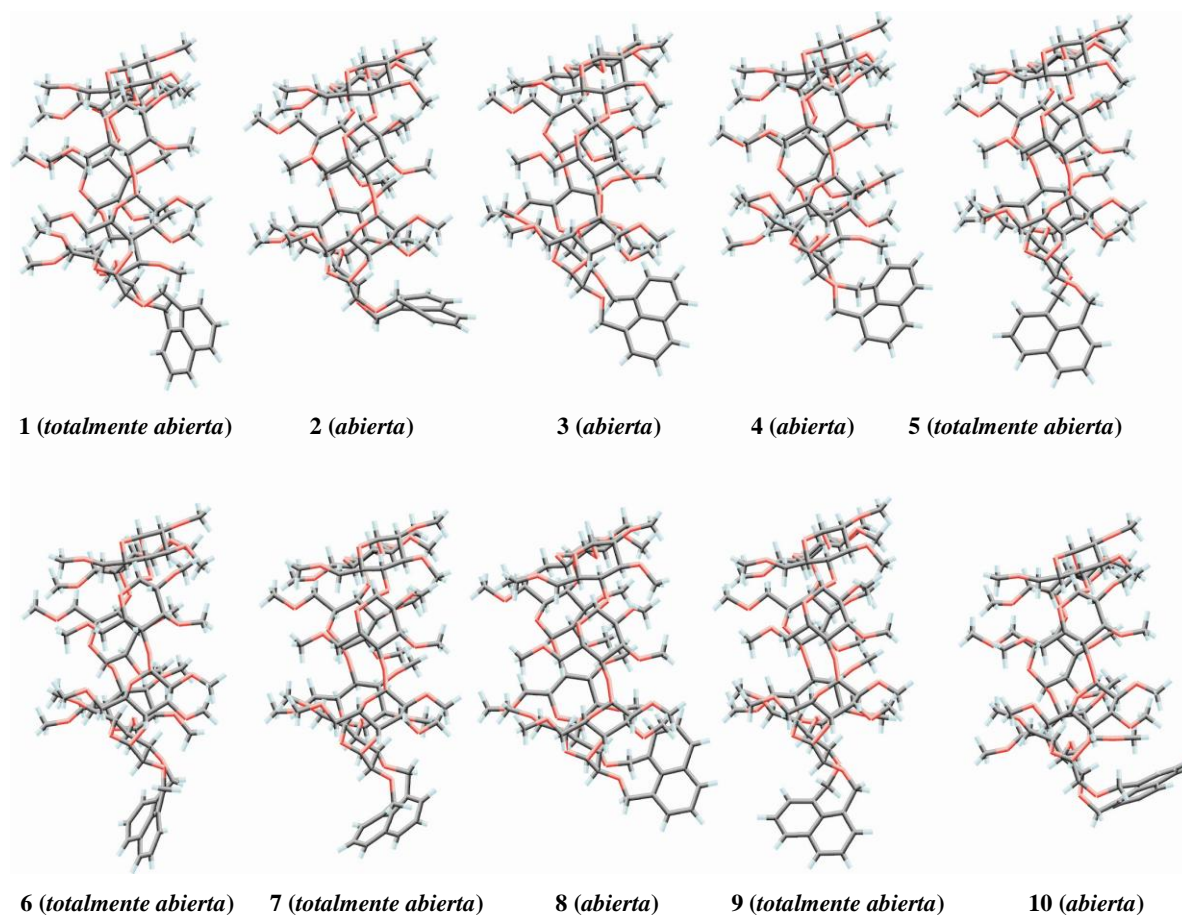


Figura 9.12. Las diez estructuras más estables obtenidas después del proceso de minimización (de mayor a menor estabilidad).

La distribución de distancias entre los centros de masas del grupo Ny y de la Nm β CD presenta un único máximo a cualquier temperatura, tal y como muestra la Figura 9.13. La distancia media solo aumenta ligeramente con la temperatura y la distribución no muestra ningún punto isobéptico que pudiera indicar un equilibrio *tapadera* \rightleftharpoons *abierta*, como anteriormente se observó con las XmCDs.²⁵ En este caso el sistema es mucho más rígido y por tanto no existe mucha variación de las conformaciones de partida, lo que debería contribuir a una mayor estabilización del dímero (Nm β CD)₂.

A partir del análisis de la trayectoria de DM realizada a dos temperaturas diferentes (350 y 600K) en el vacío para la conformación más estable *abierta* (2), se obtuvieron las distribuciones de los ángulos entre el eje del macrociclo y la dirección de los momentos de las transiciones electrónicas ¹B_b y ¹L_a, indicadas en la Figura 9.14. La conformación elegida para realizar la simulación fue *abierta* debido a que, seguramente sea ésta la que

origine principalmente la señal de dicroísmo circular inducido, ya que es menos probable que el grupo Ny produzca una señal dicroica intensa en una conformación *totalmente abierta*, en la cual se encuentra mucho más alejado de la cavidad. La distribución presenta un máximo en $89 \pm 19^\circ$ ($26 \pm 23^\circ$) para las transición 1B_b (1L_a) a 350K, mientras que 600K, debido a que se barre un mayor espacio conformacional, las distribuciones son más anchas, desplazando el máximo de 1B_b a $99 \pm 28^\circ$ o incluso haciendo que la distribución sea bimodal con dos máximos a $27 \pm 24^\circ$ y a $107 \pm 38^\circ$ para el caso de 1L_a (y también 1L_b).

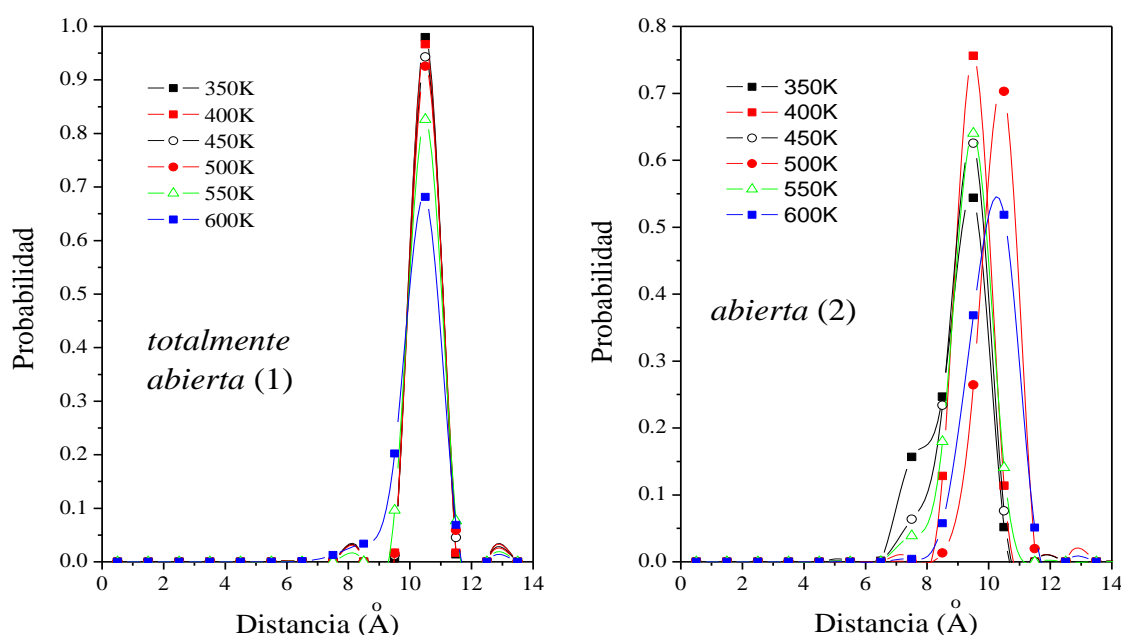


Figura 9.13. Distribuciones de probabilidad de la distancia (en Å) entre el centro de masas del grupo naftilo y el centro de la NmβCD a diferentes temperaturas para la conformación *totalmente abierta* (1) (izquierda) y *abierta* (2) (derecha).

Es importante recordar que los experimentos de RMN en cloroformo deuterado, en el que la NmβCD mayoritariamente está en forma de monómero, también estarían de acuerdo con la presencia de una conformación con disposición del grupo Ny tipo *abierta*.²² Además, esta distribución de ángulos también apoyaría los resultados deducidos de los experimentos de dicroísmo circular en disolventes no polares (la especie mayoritaria es el monómero). Los resultados mostraron una señal intensa y positiva para la transición 1B_b y de baja intensidad para la banda 1L_a (y también 1L_b) que estaría de acuerdo con una conformación donde el cromóforo se sitúa fuera de la cavidad, pero de forma perpendicular al eje del macrociclo, según las reglas de Kodaka.^{23,38,39}

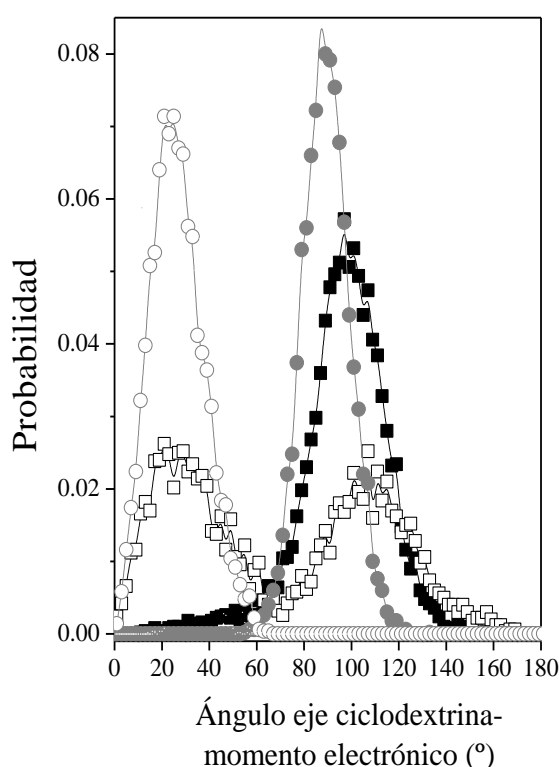


Figura 9.14. Distribución de probabilidad para los ángulos formados por el eje principal de la $Nm\beta CD$ y el momento de la transición electrónica 1B_b (símbolos rellenos) y 1L_a (símbolos abiertos) del grupo cromóforo Ny obtenidos del análisis de una trayectoria de DM de 10 ns para la conformación *abierta* (2) a 300K (círculos) y 600 K (cuadrados).

Para el caso de la $Nm\alpha CD$ y de la $Nm\gamma CD$, siguiendo los mismos protocolos se realizaron DM de 10 ns partiendo de la conformación tipo *abierta*, similar a la conformación *abierta* (2) de la $Nm\beta CD$. Decidimos partir de esta disposición ya que era la que mejor respuesta daba a los resultados experimentales de fluorescencia y DCI obtenidos previamente para la $Nm\beta CD$. La Figura 9.15 muestra las distribuciones de probabilidad para la distancia entre los centros de masas de la ciclodextrina y del grupo cromóforo Ny para la $Nm\alpha CD$ y la $Nm\gamma CD$. Del mismo modo que en la $Nm\beta CD$, se observa un único máximo a todas las temperaturas, demostrando de nuevo la ausencia de un equilibrio conformacional *tapadera* \rightleftharpoons *abierta*. La $Nm\alpha CD$ presenta una distribución bastante más estrecha debido a que, por su tamaño, se trata de un macrociclo mucho más rígido y sus movimientos están mucho más restringidos. La $Nm\gamma CD$ por el contrario presenta una mayor flexibilidad, haciendo que los picos de la distribución sean más anchos y exhibiendo una mayor libertad conformacional. Si comparamos las distribuciones de probabilidad de los tres tipos de ciclodextrinas con los valores de K_D

obtenidos, podemos observar que cuanto más flexible sea la CD y mayor sea la libertad de movimiento del cromóforo Ny unido a la misma, menor es la estabilidad del dímero formado.

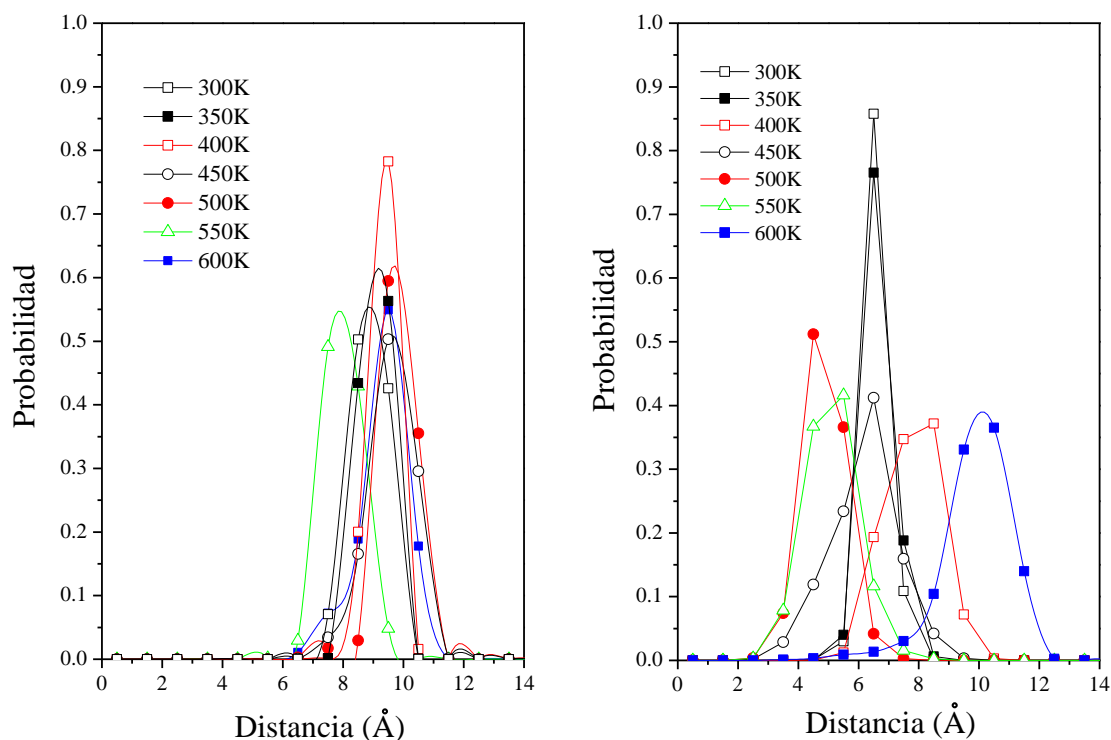


Figura 9.15. Distribuciones de probabilidad de la distancia (en Å) entre el centro de masas del grupo Ny y el centro de las ciclodextrinas NmαCD (*izquierda*) y NmγCD (*derecha*) a diferentes temperaturas.

También se obtuvieron las distribuciones de los ángulos entre el eje del macrociclo y las direcciones de los momentos de las transiciones electrónicas 1B_b y 1L_a , representadas en la Figura 9.16. Los valores medios obtenidos a 600K para la transición 1B_b fueron de $64 \pm 12^\circ$ ($73 \pm 13^\circ$) y para la 1L_a de $31 \pm 12^\circ$ ($38 \pm 17^\circ$) para la NmαCD (NmγCD). Estos valores aunque son ligeramente más bajos, siguen estando muy próximos a los obtenidos para la NmβCD.

Esta disposición de los ángulos también concuerda con las conclusiones obtenidas por DCI en los disolventes más apolares, donde la especie monomérica es la mayoritaria. El hecho de que las señales (dos bandas positivas) en los disolventes más apolares (como, por ejemplo, butanol en la Figura 9.11), y que los ángulos entre las transiciones electrónicas y el eje principal del macrociclo obtenidos de forma teórica, sean parecidos

para las tres NmCDs, demostraría que seguramente la estructura del monómero es similar en los tres sistemas.

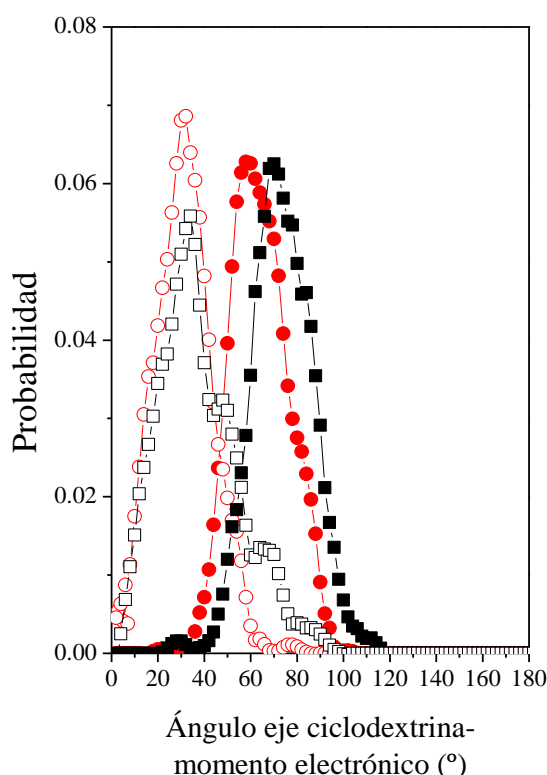


Figura 9.16. Distribuciones de probabilidad para los ángulos formados por el eje principal de la NmCD y el momento de la transición electrónica 1B_b (símbolos rellenos) y 1L_a (símbolos abiertos) del grupo cromóforo Ny para la NmaCD (rojo) y NmγCD (negro) obtenidos del análisis de una trayectoria de DM de 10 ns a 600K.

Estudio del proceso de dimerización

La Figura 9.17 muestra los cambios producidos en la energía de interacción en función de la proyección sobre el eje y de la distancia entre los centros de masas de las dos NmβCD durante el proceso de dimerización, para las conformaciones más estables de NmβCD *totalmente abierta* (1) y *abierta* (2), para los tres tipos de aproximaciones HH, HT y TT, obtenidos mediante Mecánica Molecular (MM). Aunque son cuantitativamente diferentes, sea cual sea el tipo de aproximación, todas muestran energías de interacción favorables; no obstante, la aproximación HH parece más estable energéticamente. Esta disposición estaría de acuerdo con la señal de acoplamiento excitónico observada en el espectro de DCI en agua y que, para que tenga lugar dicho fenómeno se requiere que los dos grupos cromóforos Ny se sitúen próximos en el espacio. También coincidiría con los resultados de los cálculos recientemente realizados por de C. Jaime y K. J. Naidoo⁴¹ sobre

una β CD modificada con un grupo 2-metilnaftaleno substituido en la posición 3 de una única unidad de glucopiranososa. Dichos resultados indican que la disposición más favorable es la HH, aunque en esta conformación, debido a la mayor libertad del grupo cromóforo unido en una única posición, los grupos naftilo se insertan mutuamente en la cavidad de la ciclodextrina vecina.

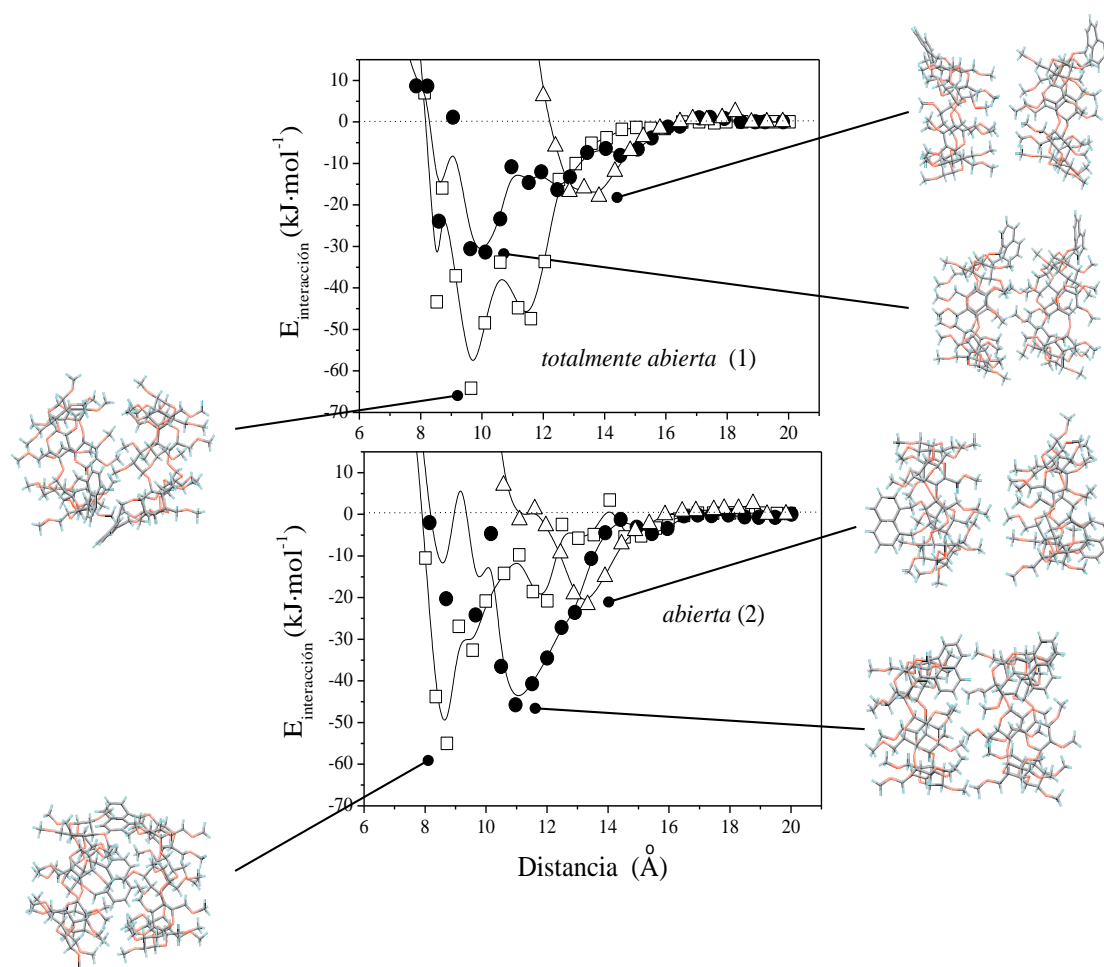


Figura 9.17. Variación de la energía de interacción cuando una segunda $Nm\beta$ CD se acerca a la $Nm\beta$ CD (coordinada y en \AA) mediante diferentes tipos de aproximaciones: HH (\square), HT (\bullet), y TT (\triangle), para las conformaciones más estables *totalmente abierta* (1) (*superior*), y *abierta* (2) (*inferior*). Las flechas indican las conformaciones de mínimos de energía de interacción, cuyas estructuras se encuentran representadas.

Las interacciones atractivas de tipo van der Waals son las más importantes para cualquier tipo de dímero y conformación de partida, aunque al contrario que la $Xm\beta$ CD, la contribución electrostática contribuye significativamente a la estabilización del dímero para la orientación HH. Estos resultados también apoyan el hecho experimental de $\Delta H^0 < 0$, típico de interacciones atractivas tipo van der Waals (y/o electrostáticas).

Los resultados de MM para las *Nm* α CD y *Nm* γ CD se muestran en la Figura 9.18. En los dos casos se partió de las conformaciones tipo “abierta” empleadas en el estudio previo del monómero. Los resultados indican que la aproximación más favorable en ambos casos es la de tipo HH, aunque el resto de las orientaciones también tienen energías de interacción favorables. No obstante, la aproximación HT para la *Nm* γ CD posee una energía bastante negativa y muy próxima a la HH.

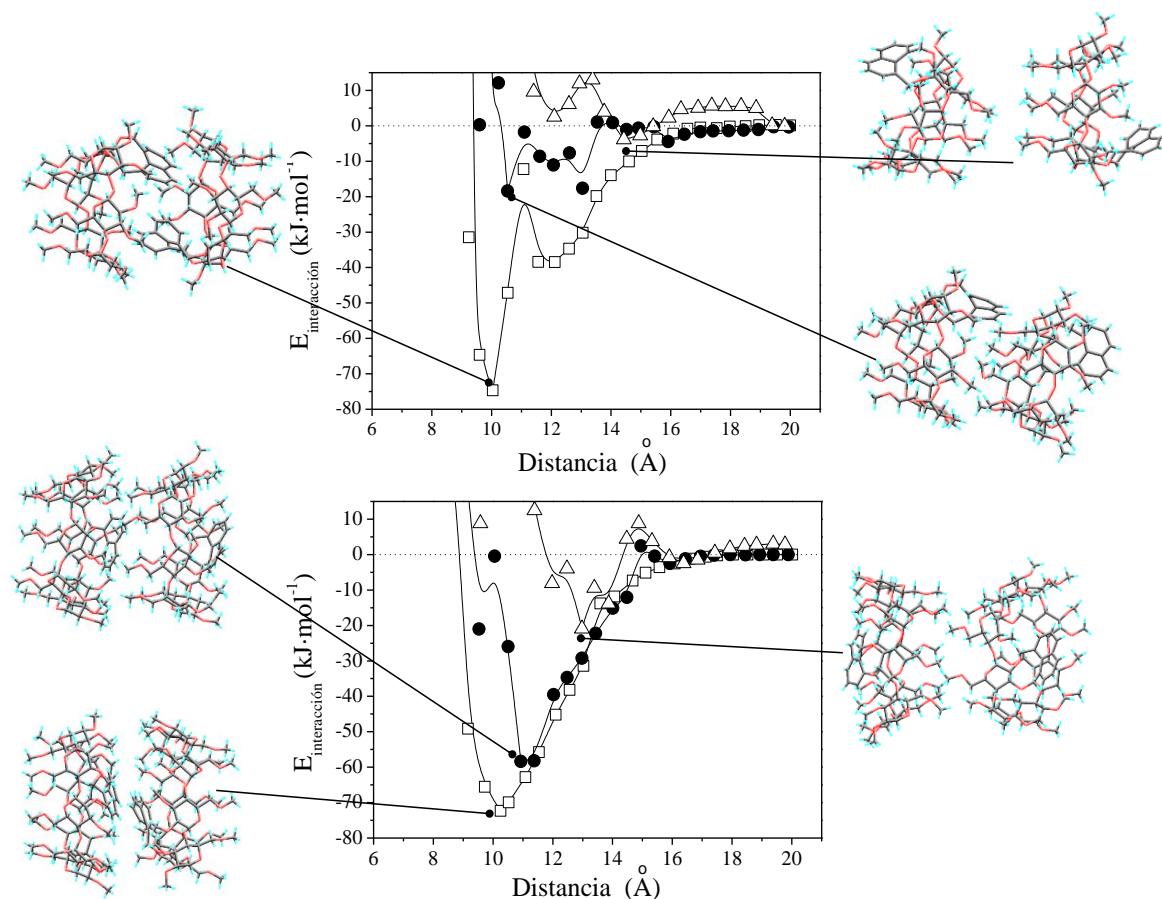


Figura 9.18. Variación de la energía de interacción cuando una segunda *Nm*CD se acerca a la *Nm*CD (coordinada y en Å) mediante diferentes tipos de aproximación: HH (\square), HT (\bullet), y TT (\triangle), para *Nm* α CD (*superior*), y *Nm* γ CD (*inferior*). Las flechas señalan las conformaciones de mínima energía de interacción, cuyas estructuras se encuentran representadas.

Las Tablas 9.4, 9.5 y 9.6, recogen los parámetros geométricos más significativos, las diferentes contribuciones a la energía de interacción y aquellas que implican a los grupos naftilos, para las diferentes aproximaciones de *Nm*CDs en las conformaciones de mínima energía de interacción. Excepto para la aproximación TT donde la interacción Ny-Ny obviamente apenas existe, las contribuciones para las tres *Nm*CDs son favorables.

Las estructuras de mínima energía de interacción se encuentran superpuestas en las Figuras 9.17 y 9.18. Dichas estructuras se optimizaron de nuevo y se utilizaron en las simulaciones de DM.

Tabla 9.4. Energía de interacción, contribuciones de los diferentes tipos de energías ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) y algunos parámetros geométricos para las estructuras (1) y (2) del dímero de $\text{Nm}\beta\text{CD}$ correspondientes a las estructuras de mínima energía de interacción para las aproximaciones HH, HT y TT obtenidas por MM. Entre paréntesis se indican los resultados para las estructuras de mínima energía de interacción obtenidos del análisis de las trayectorias de 1ns de DM en presencia de agua como disolvente.

Parámetros	HH(1)	HT(1)	TT(1)	HH(2)	HT(2)	TT(2)
Distancia CD-CD (\AA)	9.6 (9.8)	10.1 (10.0)	13.8 (13.3)	8.7(9.6)	11.0(11.2)	13.3(13.9)
Distancia Ny1-Ny2 (\AA)	4.9 (5.1)	8.5(10.3)	21.8(19.5)	6.8(7.5)	10.6(10.4)	22.5(24.0)
θ ($^\circ$)	11.2(18.2)	0.1(-133.4)	13.4 (26.4)	40.3(25.6)	0.3(-171.5)	19.3(14.7)
$E_{\text{interacción}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-64.2(-108.9)	-31.4(-67.2)	-17.8(-31.8)	-55.0(-93.7)	-45.8(-51.6)	-21.7(-25.8)
electrostática	-11.0(-17.5)	-2.8 (-4.4)	+5.0 (+4.3)	-20.8(-11.1)	-3.3(+5.4)	2.0(-1.3)
van der Waals	-53.1 (-91.4)	-28.5(-62.8)	-22.9 (-36.1)	-34.3(-82.7)	-42.5(-57.0)	-27.0(-24.5)
E_{inter} Ny2- NmCD1	-49.9 (-44.5)	-0.2 (-6.9)	0 (0)	-37.3(-17.3)	-4.3 (-13.5)	0 (0)
E_{inter} Ny1- NmCD2	-41.8 (-61.0)	-12.1(-5.3)	0 (0)	-18.5(-23.4)	-23.6(-2.2)	0 (0)
E_{inter} Ny1-Ny2	-29.4 (-36.4)	+0.6 (-1.0)	0 (0)	-8.4 (-12.3)	-3.5(-3.8)	0 (0)

En las Figuras 9.19 y 9.20 se muestran las historias de las energías de interacción y la distancia entre centros de masa de las unidades de NmCD en el dímero $(\text{NmCD})_2$ para la simulación de DM de 1ns en presencia de agua a 300K. Las Tablas 9.4, 9.5 y 9.6 contienen entre paréntesis algunos de los parámetros energéticos y geométricos más importantes de las estructuras de mínima energía de interacción obtenidas del análisis de las diferentes trayectorias de DM. Al igual que en los resultados de MM, para la $\text{Nm}\beta\text{CD}$ la aproximación que parece más estable es la HH, aunque la HT también tiene una energía favorable durante toda la trayectoria. Para la $\text{Nm}\alpha\text{CD}$, la disposición HH es la única que no se disocia al final de la trayectoria y en el caso de la $\text{Nm}\gamma\text{CD}$, las disposiciones HH y HT poseen energías de interacción favorables, aunque HT parece más estable. Por el contrario, para ninguna de las tres NmCD s la disposición TT es estable y acaba disociándose en la parte final de las trayectorias con el consiguiente aumento de distancias entre los monómeros.

Tabla 9.5. Energía de interacción, contribuciones de los diferentes tipos de energías ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) y algunos parámetros geométricos para las estructuras del dímero de $Nm\alpha\text{CD}$ correspondientes a las estructuras de mínima energía de interacción para las aproximaciones HH, HT y TT obtenidas por MM. Entre paréntesis se indican los resultados para las estructuras de mínima energía de interacción obtenidos del análisis de las trayectorias de 1ns de DM en presencia de agua como disolvente.

Parámetros	HH	HT	TT
Distancia CD-CD (\AA)	10.0 (10.55)	10.5(10.66)	14.4(16.35)
Distancia Ny1-Ny2 (\AA)	6.8 (8.77)	11.4(11.07)	24.1(27.50)
θ ($^\circ$)	83.5(79.99)	95.5(82.09)	66.2(72.42)
$E_{\text{interacción}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-74.7(-86.91)	-18.4(-81.63)	-3.9(-18.57)
electrostática	-31.4 (-15.08)	-7.8 (1.53)	9.7(24.93)
van der Waals	-43.3(-161.52)	-10.6(-83.165)	-13.5(-16.51)
E_{inter} Ny2- $Nm\text{CD}1$	-16.5(-57.87)	-0.2 (-0.43)	0
E_{inter} Ny1- $Nm\text{CD}2$	-46.6(-15.23)	11.3(-13.15)	0
E_{inter} Ny1-Ny2	-7.0(-2.73)	-0.2(-0.43)	0

Tabla 9.6. Energía de interacción, contribuciones de los diferentes tipos de energías ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) y algunos parámetros geométricos para las estructuras del dímero de $Nm\gamma\text{CD}$ correspondientes a las estructuras de mínima energía de interacción para las aproximaciones HH, HT y TT obtenidas por MM. Entre paréntesis se indican los resultados para las estructuras de mínima energía de interacción obtenidos del análisis de las trayectorias de 1ns de DM en presencia de agua como disolvente.

Parámetros	HH	HT	TT
Distancia CD-CD (\AA)	10.3(11.2)	10.9(10.4)	13.0(13.7)
Distancia Ny1-Ny2 (\AA)	3.8(4.1)	10.7(10.8)	19.2(21.8)
θ ($^\circ$)	82.8(79.3)	85.0(74.7)	56.2(66.2)
$E_{\text{interacción}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-72.3(-85.7)	-58.4(-110.8)	-20.9(-27.7)
electrostática	-21.7(-4.9)	-2.7(-5.7)	-7.5(4.1)
van der Waals	-50.6(-80.8)	-55.7(-105.0)	-13.4(-31.8)
E_{inter} Ny2- $Nm\text{CD}1$	-35.2(-41.2)	0(-1.3)	3.8(0)
E_{inter} Ny1- $Nm\text{CD}2$	-26.3(-27.9)	-0.3(-22.3)	0.5(0)
E_{inter} Ny1-Ny2	-5.3(-3.9)	0(-1.3)	0(0)

Las estructuras de mínima energía para HH y HT para $(Nm\text{CD})_2$ obtenidas del análisis de DM de 1 ns en presencia de agua a 300K se muestran en las Figuras 9.20 y 9.22. Los dímeros para $(Nm\beta\text{CD})_2$ y $(Nm\alpha\text{CD})_2$ de la forma HH-abierta (2) y HH (abierta) respectivamente, respaldarían la mayor parte de los resultados experimentales. En esta aproximación, los grupos Ny se encuentran separados a una distancia de alrededor

7-8 Å y, aunque la interacción entre ellos es favorable, se encuentran lejos de disponerse en una estructura paralela tipo sándwich, lo que está de acuerdo con la ausencia de excímeros en el espectro de emisión (Figura 9.3). Es importante resaltar que las distancias entre los cromóforos Ny de $N\alpha$ CD y $N\beta$ CD en el dímero HH para la estructura de mínima energía, encaja perfectamente con la distancia requerida para que tenga lugar acoplamiento excitónico, que para este tipo de derivados de naftaleno se encuentra alrededor de 7 Å.⁴²

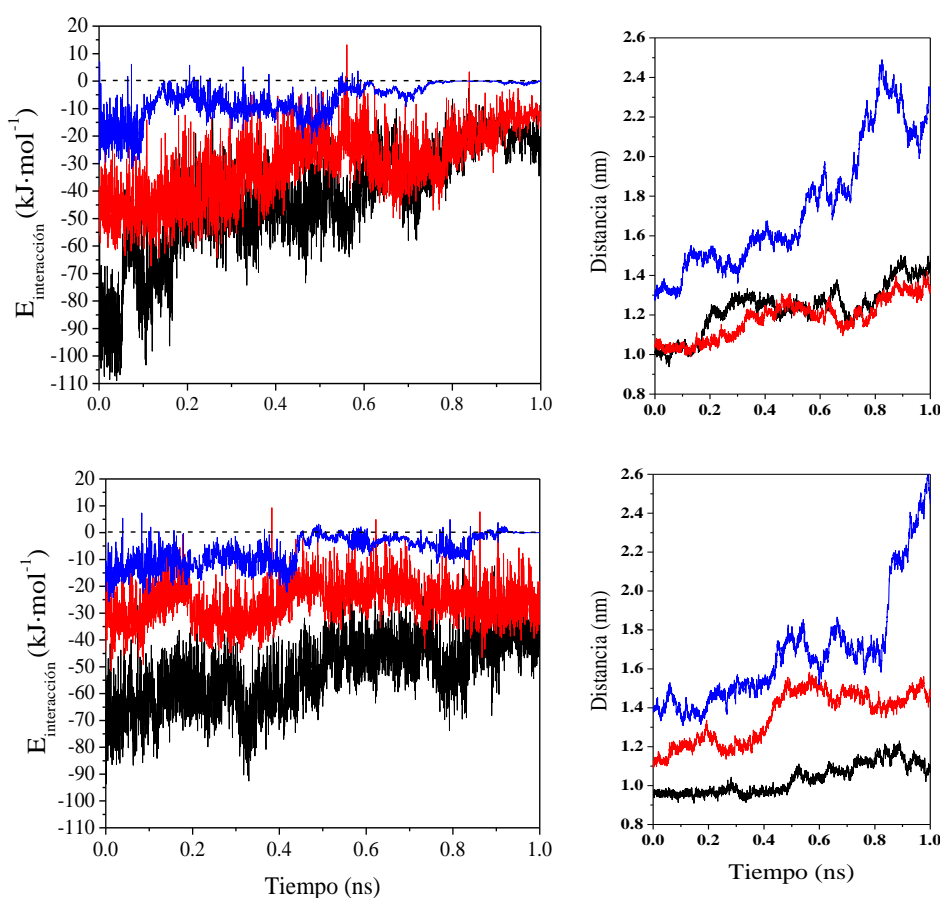


Figura 9.19. Historias de las energías de interacción y la distancia entre los centros de masas de cada una de las ciclodextrina en el dímero $(Nm\beta CD)_2$ para las aproximaciones HH (negro), HT(rojo) y TT(azul) partiendo de las estructuras de menor energía obtenidas por cálculos previos de MM para las conformaciones *totalmente abierta* (1) (*superior*) y *abierta* (2) (*inferior*).

La aproximación más favorable para el dímero $(Nm\gamma CD)_2$ es la HT indicada en la Figura 9.22. En esta disposición, los cromóforos se encuentran alejados en el espacio y dispuestos aproximadamente de forma perpendicular al eje de la CD (paralelo al macroanillo) pero en las proximidades del interior de su cavidad y de la vecina (al menos uno de ellos), tal y como se predijo en los experimentos de DCI.

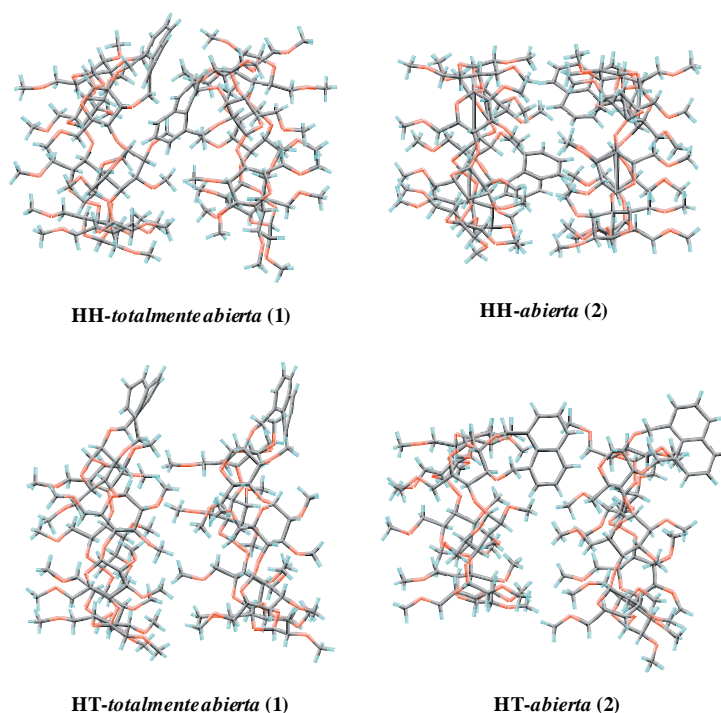


Figura 9.20. Estructuras de mínima energía para las aproximaciones HH (*superior*) y HT (*inferior*) del dímero $(Nm\beta CD)_2$ obtenidas del análisis de las simulaciones de DM de 1 ns. Las conformaciones de partida fueron *totalmente abierta* (1) y *abierta* (2).

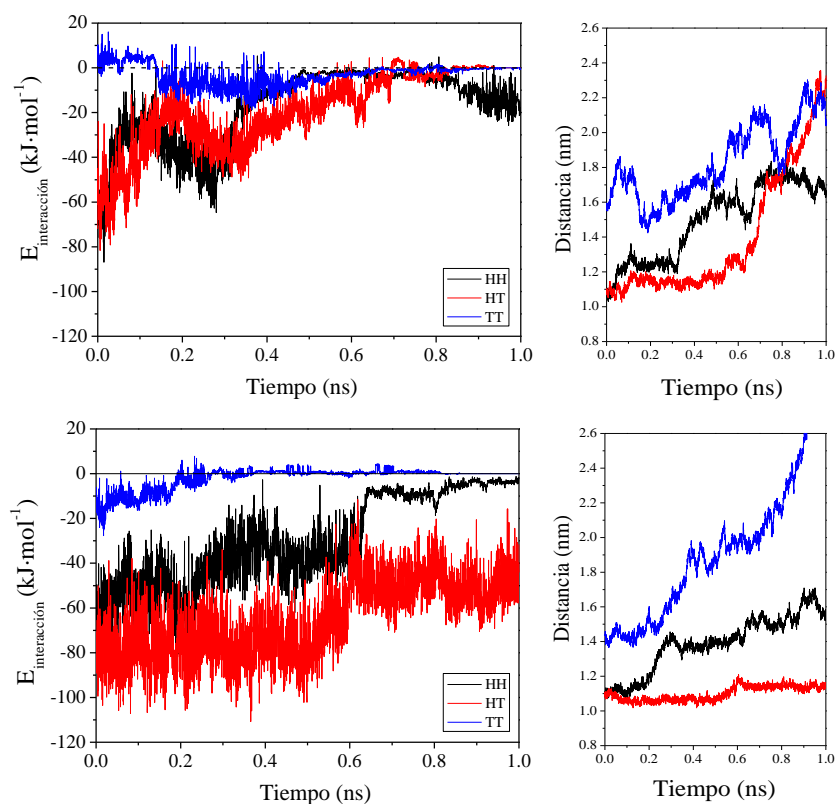


Figura 9.21. Historias de las energías de interacción y la distancia entre los centros de masas de cada una de las ciclodextrina en el dímero $(Nm\alpha CD)_2$ (*superior*) y $(Nm\gamma CD)_2$ (*inferior*) para las aproximaciones HH (negro), HT(rojo) y TT(azul) partiendo de las estructuras de menor energía obtenidas por cálculos previos de MM.

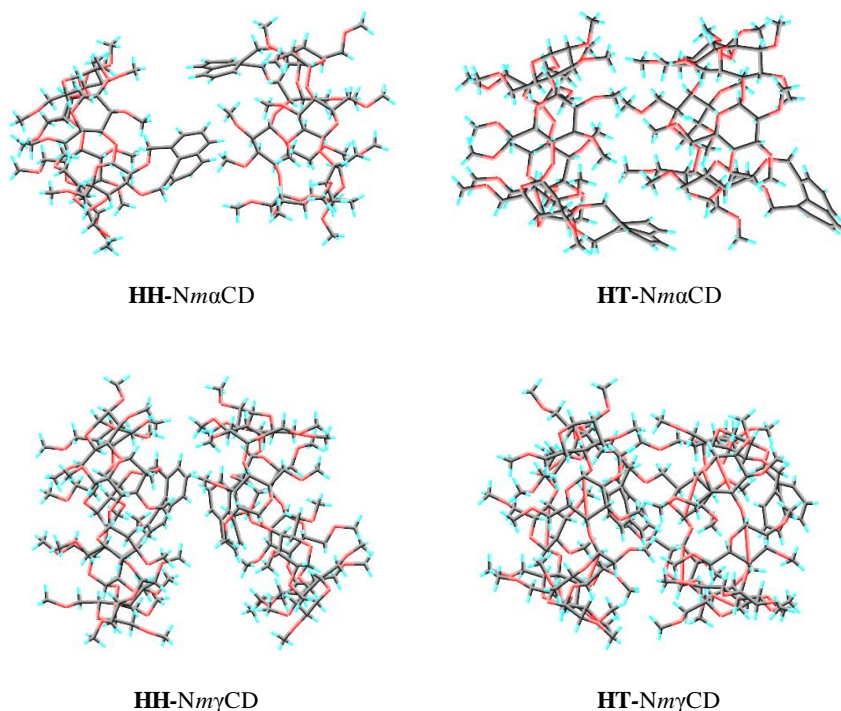


Figura 9.22. Estructuras de mínima energía para las aproximaciones HH (*izquierda*) y HT (*derecha*) del dímero (NmaCD)₂ (*superior*) y (NmγCD)₂ (*inferior*) obtenidas del análisis de la simulación de DM de 1 ns. Las conformaciones de partida en ambos casos fue tipo *abierta*.

No obstante, si esta disposición HT en la (NmγCD)₂ es estable, se podría pensar en la posibilidad de que se pudiesen dar asociaciones de mayor tamaño, en forma de trímeros u oligómeros. Para comprobar la estabilidad de estas estructuras, también se realizó un estudio teórico de MM y DM siguiendo los mismos protocolos que para el dímero o para el trímero de su homóloga (XmγCD)₂.²⁹ Para esta última, la dimerización HT también era favorable, aunque no la asociación con otra XmγCD (Capítulo 8). Tal y como muestran los resultados (Figura 9.22), las interacciones entre las diferentes unidades de NmγCD que forman el trímero (NmγCD)₃, son favorables durante toda la trayectoria de DM de 1.5 ns (en lugar de 1 ns como se hizo para el (XmγCD)₂). En esta disposición los grupos naftaleno están aproximadamente paralelos a la cavidad pero localizados en el interior de la misma y/o de la vecina, lo que también estaría de acuerdo con las señales negativas de las bandas observadas en el espectro de dicroísmo circular.

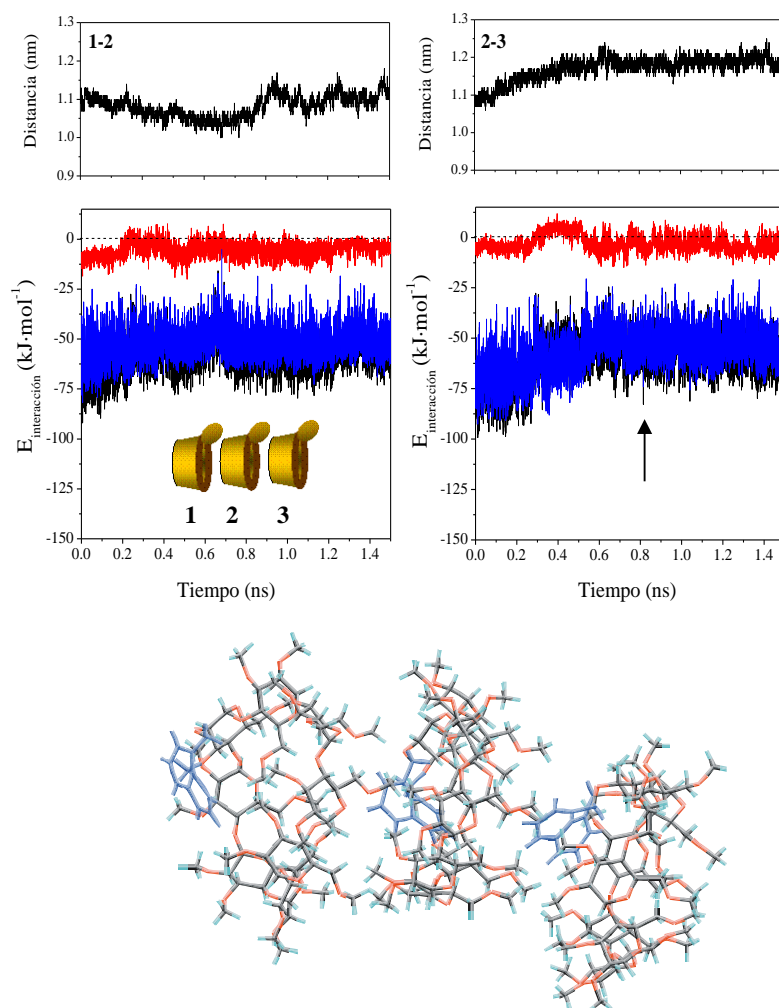


Figura 9.23. (*Superior*) Historias de las distancias entre los centros de masas de los oxígenos glicosídicos y (*inferior*) las energías de interacción totales (negro) y las contribuciones de van der Waals (azul) y electrostáticas (rojo) para un trímero ($Nm\gamma CD$)₃ formado por 3 unidades $Nm\gamma CD$ dispuestas de forma HT. Los parámetros están indicados para pares de $Nm\gamma CD$ de forma 1-2 (izquierda) y 2-3 (derecha) para una trayectoria de DM de 1.5 ns a 300 K. La estructura del trímero mostrada fue obtenida después de una trayectoria de 0.839 ns (indicada por la flecha) y corresponde a la de mínima energía potencial.

9.3 Conclusiones

Para el estudio de las ciclodextrinas modificadas $NmCDs$ se emplearon técnicas de fluorescencia, dicroísmo circular, MM y DM. Las constantes de dimerización en agua fueron muy elevadas para el caso de la $Nm\alpha CD$ ($K_D=776\times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a 25°C) y $Nm\beta CD$ ($K_D=92\times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a 25°C) siendo mucho mayores que para sus homólogas $XmCDs$. Los procesos de asociación en ambos casos se encuentran favorecidos entálpica y entrópicamente. El valor de $\Delta H^0 < 0$ es similar al de formación de los dímeros de ($XmCD$)₂, aunque el $\Delta S^0 > 0$ contrasta con el valor negativo obtenido para las $XmCDs$. El signo y valor cuantitativo de ΔS^0 es debido posiblemente a la mayor pérdida de moléculas

de agua ordenada durante la dimerización, ya que los grupos naftilo son mucho mayores y presentan un carácter más hidrofóbico que los anillos derivados del benceno. En el caso de la $Nm\gamma$ CD, la constante de dimerización ($K_D=401 \text{ M}^{-1}$ a 25°C) es bastante más pequeña que para las $Nm\alpha$ - y $Nm\beta$ CDs, pero sigue siendo mayor que su análoga con xilileno. Aunque, la variación de entropía es también $\Delta S^0 > 0$, como para el resto de Nm CDs, en esta caso se trata de un proceso endotérmico, $\Delta H^0 > 0$. Su gran tamaño y flexibilidad conformacional son responsables del debilitamiento de las interacciones intermoleculares en el dímero.

Tanto los experimentos realizados por dicroísmo circular, como por fluorescencia indican que la agregación tiene lugar en disolventes de alta polaridad. Los resultados obtenidos de la heterodimerización muestran únicamente la presencia de sistemas tipo $Nm\gamma$ CD/ $m\gamma$ CD para el caso de la $Nm\gamma$ CD, demostrando que es favorable la formación de asociaciones tipo HT. Al igual que para oXy, solo la $m\alpha$ CD forma complejo de inclusión con el cromóforo oNy.

Las simulaciones de DM realizadas sobre el monómero aislado muestran, a diferencia de las Xm CDs, la ausencia de cualquier equilibrio conformacional del tipo *tapadera* \rightleftharpoons *abierta*. Además, Nm CDs son estables en una conformación tipo *abierta* bastante similar para los tres casos. Dicha estructura respalda los espectros obtenidos por dicroísmo circular. Los resultados teóricos también apoyan la mayoría de evidencias experimentales (tiempos de vida, desactivación de fluorescencia, señales de acoplamiento excitónico en dicroísmo circular, etc) sobre la presencia de dímeros tipo HH para $Nm\alpha$ CD y $Nm\beta$ CD y tipo HT para $Nm\gamma$ CD. En las $(Nm\alpha\text{CD})_2$ y $(Nm\beta\text{CD})_2$ los grupos naftilos están lo suficientemente cerca como para que sus transiciones electrónicas se acoplen, pero sin disponerse en forma tipo sándwich y sin que se produzca la penetración de un cromóforo en la cavidad de la CD vecina, pero quedando relativamente protegidos del disolvente. En el caso de la $Nm\gamma$ CD, los cálculos teóricos indican la presencia de asociaciones en forma de trímeros y posiblemente oligómeros de mayor número de unidades de $Nm\gamma$ CD.

9.4 Referencias

- (1) Wang, P. F.; Jullien, L.; Valeur, B.; Filhol, J. S.; Canceill, J.; Lehn, J. M. *New J. Chem.* **1996**, 20, 895.
- (2) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7071.

- (3) McAlpine, S. R.; Garcia-Garibay, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4269.
- (4) Gao, X.-M.; Tong, L.-H.; Zhang, Y.-L.; Hao, A.-Y.; Inoue, Y. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 969.
- (5) Gao, X.-M.; Zhang, Y.-L.; Tong, L.-H.; Ye, Y.-H.; Ma, X.-Y.; Liu, W.-S.; Inoue, Y. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *39*, 77.
- (6) Park, K. K.; Kim, Y. S.; Lee, S. Y.; Song, H. E.; Park, J. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2114.
- (7) Park, J. W.; Lee, S. Y.; Kim, S. M. *J. Photochem. Photobiol., A* **2005**, *173*, 271.
- (8) Moriwaki, F.; Kaneko, H.; Ueno, A.; Osa, T.; Hamada, F.; Murai, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3619.
- (9) Ueno, A.; Moriwaki, F.; Osa, T.; Hamada, F.; Murai, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 465.
- (10) Ueno, A.; Moriwaki, F.; Osa, T.; Hamada, F.; Murai, K. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1571.
- (11) Berberan-Santos, M. N.; Canceill, J.; Brochon, J. C.; Jullien, L.; Lehn, J. M.; Pouget, J.; Tauc, P.; Valeur, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6427.
- (12) Berberan-Santos, M. N.; Pouget, J.; Valeur, B.; Canceill, J.; Jullien, L.; Lehn, J. M. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11376.
- (13) Berberan-Santos, M. N.; Canceill, J.; Gratton, E.; Jullien, L.; Lehn, J.-M.; So, P.; Sutin, J.; Valeur, B. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 15.
- (14) McAlpine, S. R.; Garcia-Garibay, M. A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8307.
- (15) McAlpine, S. R.; Garcia-Garibay, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2750.
- (16) Nakashima, H.; Yoshida, N. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4997.
- (17) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7186.
- (18) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 5177.
- (19) Park, J. W.; Lee, S. Y.; Song, H. J.; Park, K. K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9505.
- (20) Zhao, Y.; Gu, J.; Chi, S. M.; Yang, Y. C.; Zhu, H. Y.; Wang, Y. F.; Liu, J. H.; Huang, R. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29*, 2119.
- (21) González-Álvarez, M. J.; Méndez-Ardoy, A.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Photochem. Photobiol. A* **2011**, *223*, 25.
- (22) Balbuena, P.; Lesur, D.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Commun.* **2007**, 3270.

- (23) Kodaka, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 8101.
- (24) Platt, J. R. *J. Chem. Phys.* **1949**, *17*, 484.
- (25) González-Álvarez, M. J.; Balbuena, P.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717.
- (26) Mendicuti, F. *Trends Phys. Chem.* **2006**, *11*, 61.
- (27) Usero, R.; Alvariza, C.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 1103.
- (28) Alvariza, C.; Usero, R.; Mendicuti, F. *Spectrochim. Acta, Part A* **2007**, *67*, 420.
- (29) González-Álvarez, M. J.; Vicente, J.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975.
- (30) Eftink, M. R.; Andy, M. L.; Bystrom, K.; Perlmutter, H. D.; Kristol, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6765.
- (31) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875.
- (32) Liu, Y.; Zhao, Y.-L.; Zhang, H.-Y.; Fan, Z.; Wen, G.-D.; Ding, F. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 8836.
- (33) Song, Y.; Chen, Y.; Liu, Y. *J. Photochem. Photobiol., A* **2005**, *173*, 328.
- (34) Mallard, I.; Landy, D.; Bouchemal, N.; Fourmentin, S. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 35.
- (35) Wang, L.; Zhong, C.; Xue, P.; Fu, E. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4874.
- (36) Cromwell, W. C.; Bystrom, K.; Eftink, M. R. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 326.
- (37) Lo, M. P.; D'Anna, F.; Riela, S.; Gruttadauria, M.; Noto, R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9163.
- (38) Kodaka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3702.
- (39) Kodaka, M. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 2110.
- (40) Pozuelo, J.; Madrid, J. M.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *Comput. Theor. Polym. Sci.* **1996**, *6*, 125.
- (41) Gamielidien, M. R.; Maestre, I.; Jaime, C.; Naidoo, K. J. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 452.
- (42) Berova, N.; Nakanishi, K. Exciton Chirality Method: Principles and Applications. En *Circular Dichroism: Principles and Applications*; Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R. W., Editors, Eds.; Wiley-VCH, 2000; pp 337.

**Study of the Complexation of a
Polarity Sensitive Probe with
Modified Cyclodextrins**

10.1 Introduction

One of the main interest of CDs lies in their ability to exhibit inclusion phenomena with guest molecules in aqueous media, which enables them to be effective receptors for organic, inorganic and biological substrates in the hydrophobic cavity of the CDs.^{1,2} This is why CDs have attracted interest as catalysts,³ enzyme mimics,⁴ functional building blocks for functional devices,⁵ drug delivery systems,⁶ etc. The modification of the natural CDs with organic substituents has been known to significantly alter the molecular binding ability and selectivity towards a variety of guests in comparison with natural CDs.^{7,8}

It is important to mention that modified CDs can undergo association processes to create non-bonded dimers and/or even larger supramolecular assemblies in aqueous solution (as indicated in Chapter 8 and 9) whose equilibria may affect the inclusion phenomena of any guest molecule.⁹⁻¹⁸ Although there are many studies on the complexation of natural and modified CD with guest molecules, few of them take into account other competitive processes, like the possible aggregation of CDs.^{9,11,12}

The modified CDs employed were CD derivatives bearing a cap-like aromatic group attached, simultaneously, to both secondary positions in a single glucopyranosyl subunit through a bidentate hinge, named 2¹,3¹-O-(o-Xylylene)-per-O-Me- α -, β - and γ -cyclodextrins ($Xm\alpha$ CD, $Xm\beta$ CD and $Xm\gamma$ CD respectively).¹⁹ In Chapter 8 we demonstrated by Molecular Mechanics (MM) and Molecular Dynamics (MD) simulations the presence, at the lowest Xm CD concentrations, of an strongly temperature-dependent *open* \rightleftharpoons *capped* equilibrium, which is significantly displaced to the *open* form. This result was also supported by NMR.¹⁹ We have also confirmed the existence of relatively stable (Xm CD)₂ dimers in water.^{16,19} Small dimerization equilibrium constants ($K_D \sim 180$, ~ 200 and $\sim 250 \text{ M}^{-1}$ for $Xm\alpha$ -, β - and γ CDs respectively) were reported at 25 °C. Dimerization processes were always accompanied by $\Delta H^0 < 0$ and $\Delta S^0 < 0$. The most stable dimers in water, whose fraction increases (decreases) with Xm CD concentration (temperature), are those formed when two *open* Xm CDs monomers approach through their secondary faces (head-to-head) at distances were both xylylene groups interact without penetrating in the partner CD cavity.

Our special interest in this chapter is to study the thermodynamics of the complexation of Xm CDs, which also have the ability to dimerize, with a polarity (and

microviscosity) sensitive fluorescence probe widely used by the group, the methyl 2-naphthalenecarboxylate (2MN) by using fluorescence techniques.²⁰⁻²⁴ Given the sensitivity of the 2MN probe to the microenvironment, we are especially interested in revealing its location in the complex and in learning more about the driving forces behind its formation. The influence of xylylene moiety was assessed by comparing the 2MN complexations with their permethylated partners (*m*CDs). MM and MD simulations were also used to determine the geometry and structure of the complexes formed, as well as the forces responsible for such formations. Especially the role of the guest-appended group interactions in determining complex geometry and the structure's relationship with the thermodynamics parameters that accompany complexation were investigated. To the best of our knowledge, the thermodynamics of the complexation of a fluorescence probe with a modified CD that can exhibit other competitive processes, have not yet been reported.^{9,11,12} This study could also serve to further the understanding of the complexation processes with other interesting guest where other competitive processes are involved.

Equilibria and association constants

For a 1:*n* guest:host complex, 2MN:CD_{*n*}, whose global equilibrium described can be written as



the binding constant *K* can be determined from the non-linear and linear dependences of some parameters derived from fluorescence steady-state or time-resolved fluorescence techniques with the initial [CD]₀, according to the following general expressions:^{1,20,21,23-28}

$$Y = \frac{Y_0 + Y_\infty \Phi K [\text{CD}]_0^n}{1 + \Phi K [\text{CD}]_0^n} \quad 10.2$$

where *Y* represents the parameter at each [CD]₀. Subscripts ∞ and 0 correspond to the *Y* values for [CD]=0 and extrapolated at [CD]→∞.

It is quite useful to derive from Equation 10.2 a linear one like:

$$\frac{[CD]_0^n}{(Y_0 - Y)} = \frac{1}{K \Phi (Y_0 - Y)} + \frac{[CD]_0^n}{Y_0 - Y_\infty} \quad 10.3$$

where Y represents any of the following parameters: (i) fluorescence intensity (I); (ii) the ratio of intensities of two characteristics bands $R(=I_{\lambda_2}/I_{\lambda_1})$, under the assumption that the emission spectra (as many of the fluorescence probes used by us¹) exhibit electronic bands centered at λ_1 and λ_2 , whose intensity are sensitive to the medium polarity (Chapter 7); and (iii) lifetime average $\langle \tau \rangle$ obtained from the analysis of the fluorescence intensity decay profiles.

When Y is I then, $\Phi = 1$ in Equations 10.2 and 10.3. If Y is R , $\Phi = I_{\infty, \lambda_1}/I_{0, \lambda_1}$ and I_{0, λ_1} and I_{∞, λ_1} can be estimated from the $I(\lambda_1)$ values at $[CD]=0$ and extrapolated at $[CD] \rightarrow \infty$. When $Y = \langle \tau \rangle$, if lifetimes are collected at λ_1 as emission wavelength, $\Phi (= \Phi_{\lambda_1})$ is also obtained in the same way. However if they are measured at λ_2 , Φ in the previous equations is $\Phi_{\lambda_2}(=I_{\infty, \lambda_2}/I_{0, \lambda_2})$. Nevertheless, both parameters are related by

$$\Phi_{\lambda_2} = \frac{R_\infty}{R_0} \Phi_{\lambda_1} \quad 1,28$$

However, if an additional CD dimerization equilibrium, defined by K_D , takes place,



then Equations 10.2 and 10.3 can be rewritten as

$$Y = \frac{Y_0 + Y_\infty \Phi K ([CD]_0 - 2[(CD)_2])^n}{1 + \Phi K ([CD]_0 - 2[(CD)_2])^n} \quad 10.5$$

and

$$\frac{([CD]_0 - 2[(CD)_2])^n}{(Y_0 - Y)} = \frac{1}{K \Phi_1 (Y_0 - Y_\infty)} + \frac{([CD]_0 - 2[(CD)_2])^n}{(Y_0 - Y_\infty)} \quad 10.6$$

where Y depends on the dimer concentration, $[(CD)_2]$, which can related to $[CD]_0$ by

$$[(CD)_2] = \frac{(4K_D[CD]_0 + 1) - \sqrt{8K_D[CD]_0 + 1}}{8K_D} \quad 10.7$$

More details on the development of equations are included in the Appendix II.

10.2 Results and discussion

Emission spectra

Emission spectra were recorded upon excitation wavelengths of 292 nm and 260 nm, which correspond to direct excitation of the 2MN guest and the *Xm*CD xylylene group, respectively. As Figure 10.1 depicts, 2MN/*Xm*CD and 2MN/*m*CD water solutions, upon 292 nm excitation, exhibit emission spectra, whose shape and maxima placements are similar to 2MN free or its water solutions with natural CDs^{21,22} and 2-hydroxypropylcyclodextrins (HPCDs).²⁰ The spectra show two main electronic bands centered on 360 nm and 385 nm whose maxima are shifted to the blue upon the addition of CD. The exception is for the 2MN/*ma*CD water solutions whose bands, particularly at the highest concentrations, appear significantly displaced to the blue.

Intensity changes upon CD addition depend on the nature of the host. While the 2MN fluorescence emission intensity increases with [CD] for *ma*CD, *mβ*CD and *Xmβ*CD water solutions, it decreases for *Xma*CD, *mγ*CD and *Xmγ*CD solutions. Nevertheless, the most important feature is found in the ratio of the intensities of both bands ($R = I_{385\text{nm}}/I_{360\text{nm}}$) which significantly decreases with [CD] and whose amount of decreasing depends strongly on the CD type. This parameter R, due to its high sensitivity to the medium polarity, is useful to follow the 2MN complexation. Figure 10.2 shows the variation of R with the concentration at 25°C for all systems studied.

As stated above, 2MN/*ma*CD spectra exhibit different features than their counterparts: a new band appears around 340 nm, the intensity of the band located at 360 nm drastically increases whereas the band at 385 nm hardly changes with [*ma*CD]. As a consequence, 2MN/*ma*CD exhibits larger variations in R with [*ma*CD] and therefore a larger polarity decreasing of the medium surrounding the 2MN takes place during the 2MN complexation with *ma*CD than with any other system. This fact confirms that 2MN is immersed in a very low polarity medium when complexed with *ma*CD. In addition,

none of the spectra exhibits a noticeable fluorescence shift or broadening of the emission band to the red during complexation at any concentration or temperature that could denote the presence of excimers or exciplexes.

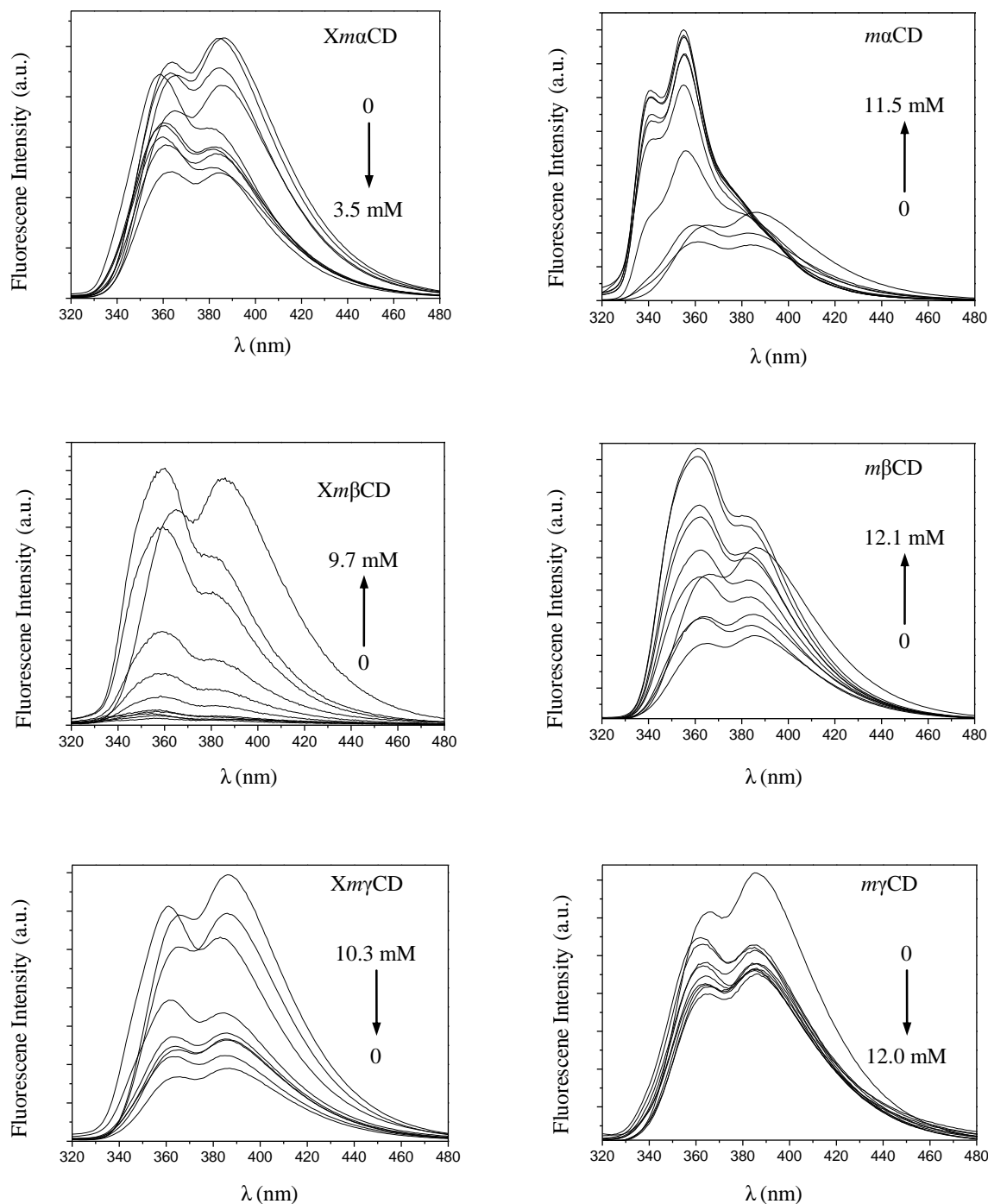


Figure 10.1. Uncorrected emission spectra of 2MN, 2MN/*m*CD and 2MN/*Xm*CD aerated aqueous solutions at different [CD] and at 25°C upon selective excitation of 2MN guest (292 nm).

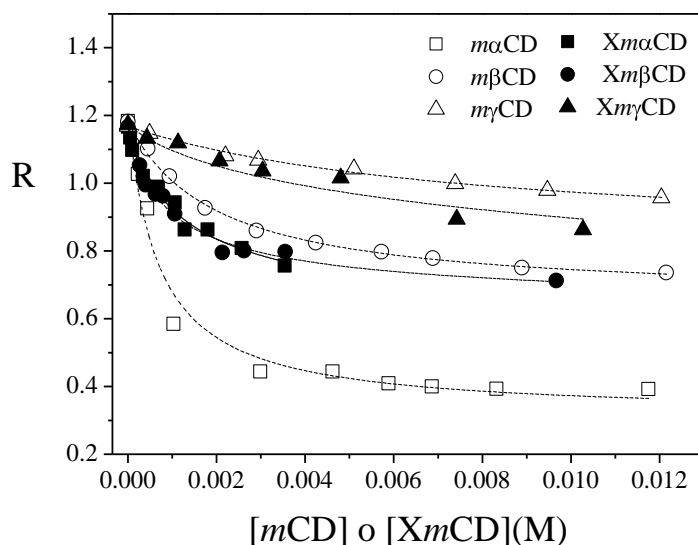


Figure 10.2. Ratios R of band intensities vs. $[CD]$ for 2MN/ $XmCD$ and mCD water solutions at 25°C. Dashed lines were obtained by adjusting the experimental data to Equation 10.2 and 10.5 for 2MN/ mCD and 2MN/ $XmCD$, respectively. Symbols are: $m\alpha$ - (\square), $m\beta$ - (\circ) and $m\gamma$ CDs (\triangle) and $Xm\alpha$ - (\blacksquare), $Xm\beta$ - (\bullet) and $Xm\gamma$ CDs (\blacktriangle).

On the other hand, the emission of 2MN/ $XmCD$ water solutions upon excitation at 260 nm presents a single band at 288 nm due to the Xy appended moiety, but also shows the double emission bands from 2MN. The behavior of the 2MN emission is similar to that observed when it is directly excited at 292 nm. The Xy emission obviously increases with $[XmCD]$, showing a linear dependence which is similar to that in the absence of 2MN.^{16,17} These facts imply that 2MN is also excited at 260 nm, but also that Xy of the $XmCD$ moiety does not transfer its excitation energy to the 2MN guest. In fact the Förster radius for the Xy \rightarrow 2MN transference was estimated to be only $\sim 1\text{\AA}$. Excitation spectra were also performed upon selecting 385 nm as emission and no evidence for the intermolecular energy transfer was observed either.

Time-resolved fluorescence

Fluorescence intensity decays selecting the direct excitation and emission wavelengths of the 2MN chromophore (292 nm/385 nm) and Xy (260 nm/288 nm) and for the Xy excitation and 2MN emission (260 nm/385 nm) were obtained.

Fluorescence decay profiles upon preferential excitation of the 2MN guest at 292 nm/385 nm for $XmCD$ and mCD water dilute solutions in the presence of 2MN were

adjusted, either to the sum of two exponential decays ($m\alpha$ -, $Xm\alpha$ - and $m\gamma$ CD/2MN water solutions) or, like 2MN in the absence of CDs, to single monoexponential decays with a lifetime of ~ 10.5 ns at 25°C ($m\beta$ -, $Xm\beta$ - and $Xm\gamma$ CD/2MN water solutions). Thus $m\alpha$ - and $Xm\alpha$ CD/2MN water solutions exhibited two components, one in the 10–12 ns range (due to the free 2MN) and the other one in the 18 ± 3 ns range. The contribution of the later one increases upon CD addition and therefore was attributed to the complexed 2MN. $m\gamma$ CD/2MN water solutions, however, show a component similar to that for the uncomplexed guest and another one due to the complexed form which is significantly faster (1–2 ns). Nevertheless, the faster component only reaches 10% of the total contribution at the largest $[m\gamma\text{CD}]$ used. The other systems, as stated above, exhibit monoexponential fluorescence intensity profiles very close to that for the uncomplexed 2MN. This is probably because the lifetime is not sensitive to the changes in microviscosity or polarity that take place during complexation.

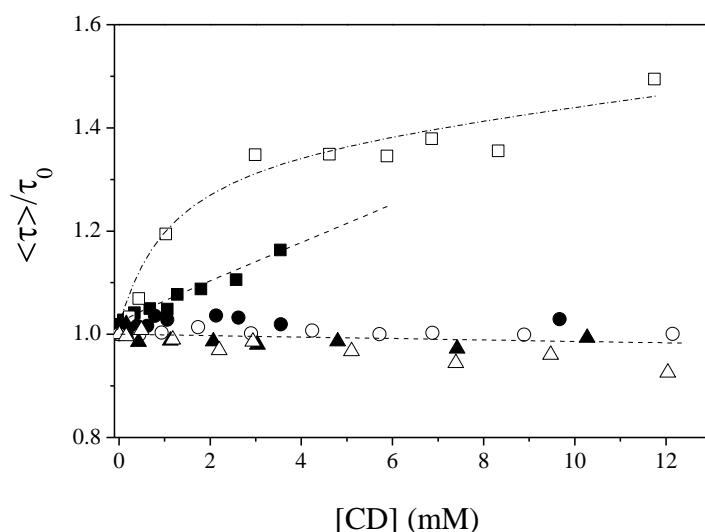


Figure 10.3. Variation of the weighted average lifetime relative to the one for 2MN in the absence of [CD], $\langle \tau \rangle / \tau_0$, vs [CD] for 2MN/ Xm CD and m CD water solutions at 25°C upon preferential excitation (292 nm) and emission (385 nm) of the 2MN guest. Symbols are: $m\alpha$ - (\square), $m\beta$ - (\circ), $m\gamma$ CDs (\triangle), $Xm\alpha$ - (\blacksquare), $Xm\beta$ - (\bullet) and $Xm\gamma$ CDs (\blacktriangle).

As shown in Figure 10.3, the $\langle \tau \rangle / \tau_0$ ratios, upon excitation and the monitoring of 2MN fluorescence, increase with CD concentration for 2MN/ $m\alpha$ CD and 2MN/ $Xm\alpha$ CD water solutions. This behavior was also observed for 2MN/ α CD,²² but not for 2MN/ α HPCD²⁰ whose $\langle \tau \rangle / \tau_0$ ratios decreases with the concentration. A very small

decrease was also observed for 2MN/*m*γCD water solutions. On the contrary, variation hardly occurred when 2MN complexed with *m*β-, *Xm*β- and *Xm*γCDs. This behavior was similar to the one observed for 2MN complexation with αHP-, βHP-, and γHPCD counterparts.¹ These differences will be justified later in this chapter.

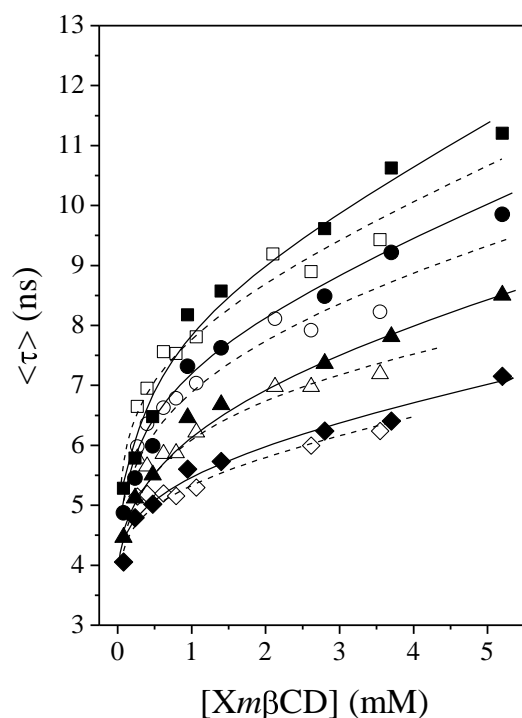


Figure 10.4. Variation of the weighted average lifetime $\langle \tau \rangle$ vs $[Xm\beta CD]$ for 2MN/ $Xm\beta CD$ (filled symbols) and $Xm\beta CD$ (open symbols) water solutions at several temperatures: 5 °C (\square); 15 °C (\circ); 25 °C (\triangle) and 35 °C (∇) obtained upon excitation (260 nm) and emission (288 nm) of xylylene group. $Xm\beta CD$ data in the absence of 2MN guest were taken from ref.¹⁶

Fluorescence decay profiles for 2MN/ $XmCD$ water solutions at different $[XmCD]$ and temperatures selecting the 260 nm/288 nm (excitation/emission) pairs are the result of three lifetime components: a short lived component (~ 0.1 ns range), ascribed to the scattering; an intermediate component, (3-6 ns range), attributed to the monomeric $XmCD$; and the slowest component, (11-20, 6-17 ns and 6-12 ns ranges $Xm\alpha$ -, β - and γ CDs respectively) attributed to the dimer $(XmCD)_2$ species. These components were very similar to those obtained for $XmCD$ water solutions at different concentrations in the absence of a 2MN guest, as we described in Chapter 8.^{16,17} For the $\langle \tau \rangle$ calculations, the component resulting from the scattering was not taken into account during the fitting process. As depicted in Figure 10.4 for 2MN/ $Xm\beta CD$ and $Xm\beta CD$ water solutions, the

$\langle \tau \rangle$ trend observed with $[XmCD]$ at any temperature, whatever the $XmCD$ was, looked quite similar either in the presence or in the absence of the 2MN. Since the fraction of the dimer formed, which has a higher lifetime component than the free one, increases, the results show a $\langle \tau \rangle$ increasing with $[XmCD]$. Nevertheless, the values of the $\langle \tau \rangle$ seem a little smaller with 2MN, particularly at the highest $XmCD$ concentrations. This means that at the same $[XmCD]$, there is less amount of dimer formed when 2MN is in the medium, which makes sense as part of $XmCD$ is complexed with the 2MN guest. The small decrease in the value of $\langle \tau \rangle$ is a consequence of that $[XmCD]_0$, which is always present in excess relative to $[2MN]_0$, *i.e.* the amount of 2MN which competes with the dimer process, is very low.

No significant variation in the $\langle \tau \rangle$ vs $[XmCD]$ behavior when 2MN/ $XmCD$ water solutions were excited at 260 nm by selecting the guest emission (at 385 nm), was observed. This again supports that $Xy \rightarrow 2MN$ intermolecular energy transfer does not take places. This also occurred even at the highest $XmCD$ concentrations, where the fraction of complexed 2MN guest is relatively large. The low Förster radius for $Xy \rightarrow 2MN$ transfer might agree with our experimental findings.

Fluorescence anisotropy

Fluorescence anisotropy (r) results upon excitation of the Xy (260 nm) and the monitoring of its emission (288 nm) in the presence of 2MN do not provide much information due to the scattering of the sample. This fact makes any interpretation of the results doubtful as it occurred before with $XmCD$ s/water and $NmCD$ s/water solutions (Chapter 8 and 9).^{16,17}

However, when the 2MN guest is excited and the anisotropies are recorded at any of the emission maxima (360 nm and 385 nm), as depicted in Figure 10.5, an increase is observed in r with $[XmCD]$ (or $[mCD]$). This enhancement is due to the larger fraction of the complexed form which has a smaller rotational diffusion rate than the free 2MN. As temperature increases, r decreases as a result of the complexed 2MN fraction dropping (if complexation, as predicted, is exothermic) and the increasing of rotational motion of both the free and complexed components with the decreasing solvent viscosity. This behavior was also observed for natural and hydroxypropylated CDs.²⁰⁻²² Whereas no major differences for the r variation from both 2MN complexations either with $XmCD$ s or mCD s, were obtained, at the highest CD concentrations the trend in the anisotropies

results can be expressed as: $r(Xm\alpha CD \text{ or } m\alpha CD) > r(Xm\beta CD \text{ or } m\beta CD) > r(Xm\gamma CD \text{ or } m\gamma CD)$. Since r decreases with the CD cavity size, we can infer that the different mobility of 2MN inside the CDs could be responsible for this behavior.

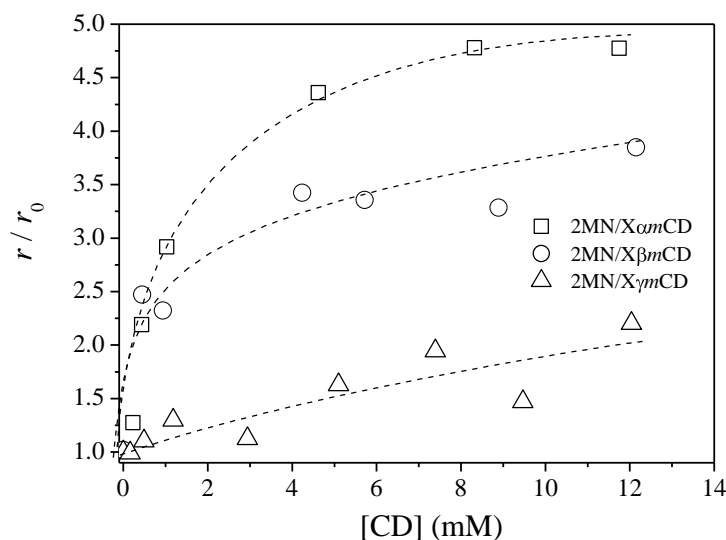


Figure 10.5. Fluorescence anisotropies r for 2MN/ $XmCD$ water solutions at different $[XmCD]$, measured as r/r_0 ratios (r_0 in the absence of $XmCD$) at 25°C.

Properties of the inner cavity

The dependence of R and τ on the polarity, ϵ , and microviscosity, η , of the medium surrounding the 2MN can be assessed by measuring 2MN dilute solutions of solvents covering a wide range of ϵ and η , as we described for other fluorescence probes (Chapter 7, 8 and 9). These graphs, depicted in Figure 10.6, represent a simple way of explaining the R and $\langle\tau\rangle$ variation during complexation, as well as estimating the effective polarity of the media surrounding 2MN when complexed with each CD.^{20,22} Emission spectra for 2MN solutions in any solvent, as displayed in Figure 10.6, show typical electronic bands whose ratio $R(=I_{385nm}/I_{360nm})$ strongly depends on the solvent polarity, decreasing as polarity drops off. This polarity decreasing is also accompanied by displacements to the blue of the maxima of both emission bands, leading to the appearance of a new band at ~ 340 nm for the most non-polar solvents (hexane and cyclohexane $\epsilon \approx 2$). The latter band which also appeared for the highest concentrated 2MN/ $m\alpha CD$ water solutions, as shown in Figure 10.1, indicates that the cavity of $m\alpha CD$ should be pretty apolar.

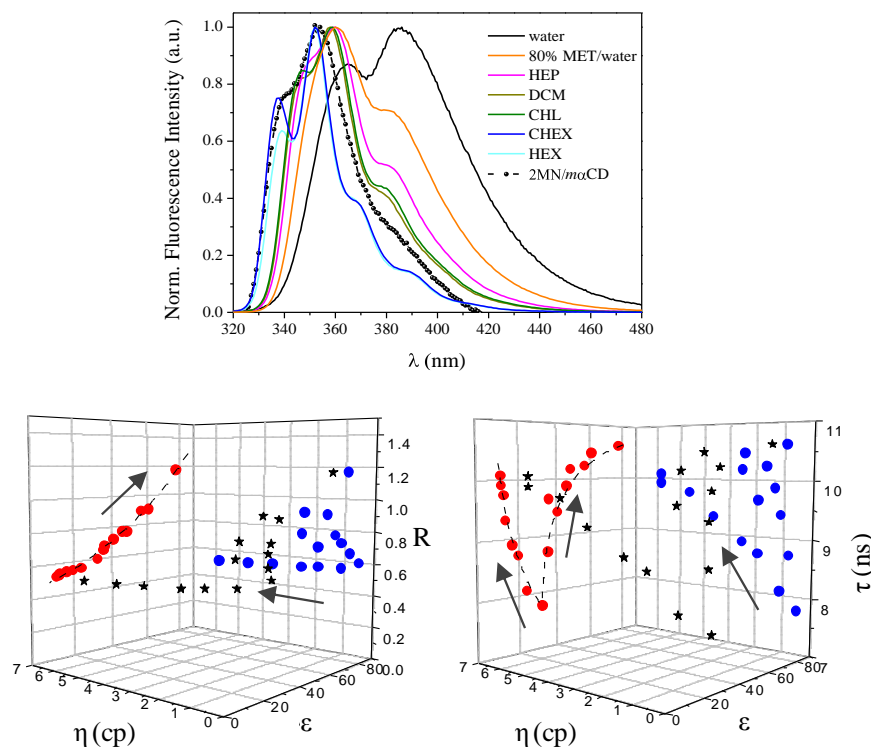


Figure 10.6. (Top) Fluorescence spectra (normalized to the maximum intensity) for dilute solutions of 2MN in solvents of different viscosity and polarity at 25°C; (bottom) changes of R and τ for 2MN with polarity (ϵ) and viscosity (η) at 25°C.

Figure 10.6 also exhibits the variation of R with ϵ and η , showing a monotonic increase with ϵ that can be adjusted to a simple polynomial equation at 25°C:

$$R = 0.409 + 5.39 \times 10^{-3} \epsilon + 5.06 \times 10^{-5} \epsilon^2 \quad 10.8$$

No special variation of R with η is observed for the n -alcohol series. The small increase in the methanol:water and ethanol:water mixtures with η , is presumably only due to solvent polarity dependence. Therefore, the R_∞ values collected in Table 10.1 and the previous equation allow us to estimate the polarity surrounding 2MN in the complexes. The results of ϵ in Table 10.1 reveal that permethylated m CD cavities are more hydrophobic than their natural counterparts.²⁹ Adding a cap-like xylene group to the secondary face of the m CD to form Xm CDs, creates hydrophobic microenvironment cavity that is quite similar for any of the Xm CDs ($\epsilon \approx 27$ -29). As reported, the inner cavities of HPCDs exhibit larger but very similar polarities ($\epsilon \approx 44$ -56).²⁰ 2MN, however,

when complexed with natural α -, β - and γ CDs was surrounded by rather different polarity environments, with ϵ values of 10, 49 and 74 respectively.¹

Table 10.1. Association constants (K) and R_∞ parameters obtained from steady-state measurements at 25° C. Values are those obtained from the non-linear adjustments of the Equation 10.2 and 10.5 for 2MN/ m CD and 2MN/ Xm CD, respectively. Values for 2MN complexation with natural (CDs) and 2-hydroxypropyl cyclodextrins (HPCDs) were taken from refs. a:^{1,21,22} b:^{1,30}

CD Type	R_∞	K (M ⁻¹)	ϵ
$m\alpha$ CD	0.31 ± 0.03	552 ± 93	< 10
$m\beta$ CD	0.66 ± 0.01	101 ± 6	35
$m\gamma$ CD	0.83 ± 0.03	95 ± 16	52
$Xm\alpha$ CD	0.59 ± 0.07	1037 ± 379	27
$Xm\beta$ CD	0.61 ± 0.03	281 ± 34	29
$Xm\gamma$ CD	0.59 ± 0.34	96 ± 87	27
α CD ^a	0.50 ± 0.02	200 ± 20	10
β CD ^a	0.80 ± 0.00	1970 ± 160	49
γ CD ^a	1.09 ± 0.02	210 ± 100	74
α HPCD ^b	0.80 ± 0.00	790 ± 20	51
β HPCD ^b	0.72 ± 0.00	2890 ± 130	44
γ HPCD ^b	0.85 ± 0.01	170 ± 10	56

Fluorescence decay profiles for 2MN dilute solutions in any of the solvents used were monoexponential. The variation of τ upon complexation is more difficult to explain due to the fact that it depends on both ϵ and η . As shown in Figure 10.6, τ increases with ϵ when the chromophore is in a relatively polar solvent ($\epsilon > 32$). However, in very non-polar and high viscosity solvents the dependence is inversed and τ increases when ϵ decreases, probably because the effect of microviscosity becomes predominant. As expected, τ increases with the solvent viscosity.

The inclusion of the 2MN guest into the cavity of a CD in aqueous solution is accompanied by a decrease in medium polarity and an increase in the microviscosity surrounding it. Both parameters would depend on the polarity and size of each m - and Xm CD cavity. According to this R_∞ should decrease upon complexation, as obtained before (Figure 10.2). The explanation of the $\langle \tau \rangle$ variation is more complicated, as is the balance of both polarity and microviscosity effects. The formation of 2MN complexes with any of the $m\alpha$ - and $Xm\alpha$ CD means that the guest will be immersed in a very non-

polar microenvironment. Despite the decrease in polarity, the 2MN microviscosity should increase drastically inside the smallest cavity, this effect being predominant on τ upon complexation. As a consequence, $\langle\tau\rangle$ should increase with $m\alpha$ - and/or $Xm\alpha$ CD concentrations. However, when 2MN penetrates inside $m\beta$ -, $Xm\beta$ - and $Xm\gamma$ CDs, it will be immersed in a medium which has ϵ values in the 27-35 range. According to Figure 10.6, τ should decrease as polarity decreases, but it should also increase with microviscosity upon 2MN complexation. The non-variation of $\langle\tau\rangle$ during the process is the result of the balance of both effects. Finally, the small $\langle\tau\rangle$ decrease for 2MN/ $m\gamma$ CDs is due to the fact that the low polarity change upon complexation ($\epsilon \approx 50$ for the inner $m\gamma$ CD) that would make τ decrease, is not compensated by the microviscosity increasing for 2MN inclusion into the larger $m\gamma$ CD cavity size.

Stability constants and stoichiometry

The Table 10.2 collected the association constants K , Φ and R_∞ parameters calculated from the non-linear adjustment of Equation 10.2 (10.5) and from the linear analysis of Equation 10.3 (10.6) at five different temperatures (5°C-45°C at 10°C intervals) for the 2MN/ m CDs (2MN/ Xm CDs) systems. Dimerization constants K_D were obtained from a previous fitting in the absence of 2MN,^{16,17} as shown in Chapter 8. Adjustments indicate 1:1 stoichiometry for all the complexes at any temperature. Φ values depend on CD type changing in the 0.8 ($Xm\alpha$ CD)-4.9 ($m\beta$ CDs) range. This dependence is less with temperature. Association constants K for the six different systems at 25°C are also summarized in Table 10.1, together with the data from 2MN complexation with natural CDs and HPCDs obtained previously by the group.^{20,22} Association constants K for 2MN/ Xm CDs are larger than for 2MN/ m CD, and the effect of the Xy group on the stabilization seems to be obvious for both $Xm\alpha$ - and $Xm\beta$ CDs, whose constants at 25°C are five times and twice (respectively) larger than those obtained for their m CD counterparts. The influence of the appended Xy moiety on the complex stabilization, however, is hardly significant for $Xm\gamma$ CD. When comparing these constants with those for 2MN complexation with natural CDs partners, a decreasing in the stability occurs for permethylated (with or without appended Xy group) β - and γ CDs. This is probably due to the significant stabilization resulting from hydrogen bonding interactions which does not take place here.

Table 10.2. Association constants K , R_∞ and Φ parameters obtained from steady state measurements in the 5-45° C range. Values were obtained from the non-linear (**and linear**) adjustments.

T(°C)	$\Phi(=\phi_{c,1}/\phi_{f,1})$	R_∞	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$
2MN/<i>ma</i>CD			
5	2.64	0.35±0.01(0.36±0.02)	736±47 (799±30)
15	2.60	0.33±0.02 (0.35±0.03)	629±75(683±43)
25	2.59	0.31±0.03(0.33±0.05)	552±93(534±40)
35	2.58	0.30±0.04(0.34±0.09)	404±92 (466±59)
45	2.50	0.29±0.04(0.27±0.12)	355±75 (361±47)
2MN/<i>Xma</i>CD			
5	1.0	0.66±0.03 (0.66±0.18)	2288±421 (2559±432)
15	0.98	0.60±0.04 (0.64±0.23)	1305±244 (1594±266)
25	0.81	0.59±0.1 (0.61±0.39)	1037±379 (1344±387)
35	0.90	0.66±0.07 (0.65±0.49)	865±250 (897±254)
45	0.93	0.63±0.08 (0.67±0.74)	510±143 (553±176)
2MN/<i>mβ</i>CD			
5	4.8	0.67±0.01 (0.67±0.07)	123±11 (122±2)
15	4.9	0.66±0.01 (0.65±0.13)	111±10 (102±3)
25	4.9	0.66±0.01 (0.65±0.07)	101±6 (97±1)
35	4.8	0.66±0.01 (0.66±0.07)	88±5 (88±1)
45	4.9	0.65±0.02 (0.66±0.07)	64±6 (69±1)
2MN/<i>Xmβ</i>CD			
5	4.0	0.62±0.03 (0.64±0.13)	351±45 (398±13)
15	4.0	0.61±0.02 (0.61±0.07)	356±30 (332±5)
25	4.1	0.61±0.03 (0.61±0.13)	281±34 (275±7)
35	4.0	0.61±0.02 (0.61±0.14)	222±25 (213±5)
2MN/<i>mγ</i>CD			
5	1.4	0.92±0.05(0.81±0.67)	124±53 (73±11)
15	1.4	0.87±0.03(0.78±0.48)	111±22 (71±8)
25	1.4	0.83±0.03(0.86±0.24)	95±16 (150±10)
35	1.4	0.78±0.05(0.83±0.68)	79±21 (102±16)
45	1.3	0.74±0.08(0.73±0.35)	61±14 (63±6)
2MN/<i>Xmγ</i>CD			
5	2.2	0.73±0.22	122±84 (89±29)
15	2.2	0.65±0.21	119±68 (36±16)
25	2.3	0.59±0.34	96±87 (4±12)
35	2.1	0.62±0.16	87 ±42 (61±13)
45	2.2	0.57±0.16	75±35 (44±13)

The larger constant for the 2MN complexes with $m\alpha$ - and $Xm\alpha$ CDs complexes with $m\alpha$ - and $Xm\alpha$ CDs must be due to the larger flexibility and size of the methylated CDs relative to the natural partners^{29,31,32} and possible deeper 2MN penetration into the cavity. The very non-polar medium in which 2MN is immersed might support this. Nevertheless, this will be dealt with again in the theoretical section of this chapter. Association constants for the complexes with HPCDs, which usually enhance their complexation capabilities with 2MN relative to their natural counterparts, also do so considerably with respect to the permethylated ones and somewhat less for xylylene substituted CD, Xm CDs.

Enthalpy and entropy changes

Table 10.3 collects the ΔH^0 and ΔS^0 values that were obtained from linear van't Hoff plots depicted in Figure 10.7. All 2MN/ m CD and 2MN/ Xm CD systems present $\Delta H^0 < 0$, which is typical of attractive van der Waals and/or hydrogen bonding (not the case) interactions. Van der Waals contribution to the binding energy strongly depends on the host-guest distance and is usually less favorable or more unfavorable as the CD cavity size relative to the guest molecule increases. This is the reason why any of the α CDs when complexed with 2MN have a more favorable enthalpy change than β CDs, whereas γ CDs have less favorable or sometimes unfavorable enthalpic terms. This can also explain the smaller negative ΔH^0 when going from the natural to the hydroxypropylated and/or to the methylated CDs. The cavity becomes more flexible and is wider due to the repulsions of the substituted groups. Adding the appending Xy moiety to m CDs leads to more favorable enthalpy changes presumably due to the additional attractive 2MN-Xy group interaction.

The ΔS^0 sign accompanying the complexation of cyclodextrins with a relatively hydrophobic guest is usually the result of a balance between the loss of entropy due the decrease in the rotational and translational degrees of freedom of the system, and the entropy gain due to the loss in order of the water shells around the guest or solvating inside de CD cavity. $\Delta S^0 < 0$ is typical of bulky guests that only penetrate partially into a relatively small cavity, its movement being moderately hindered. In these cases, the complexation process should be accompanied by a relatively large increase in the fluorescence anisotropy and strong host-guest interactions ($\Delta H^0 < 0$), as it occurs for 2MN/ α CD ($-59.8 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$).²² On the contrary, if the guest penetrates deeply inside the

wider cavity, the complexation usually comes with of a positive entropy change. This is typical of 2MN complexation with β CD (+11.7 J·K⁻¹·mol⁻¹), γ CD (+11.3 J·K⁻¹·mol⁻¹), β HPCD (+39.8 J·K⁻¹·mol⁻¹) and γ HPCD (+63.3 J·K⁻¹·mol⁻¹).

Table 10.3. Values of the variation of enthalpy (ΔH^0) and entropy (ΔS^0) during the complexation processes of 2MN with *m*CDs and *Xm*CDs from the values of *K* obtained by the non-linear curve fit. Values for 2MN complexation with natural (CDs) and 2-hydroxypropyl cyclodextrins (HPCDs) were taken from refs a:^{1,21,22} b:^{1,30}

Sistema	ΔH^0 (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^0 (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
2MN/ <i>mα</i> CD	-13.9 ± 1.4	+5.1 ± 4.6
2MN/ <i>mβ</i> CD	-11.2 ± 2.1	+0.2 ± 7.1
2MN/ <i>mγ</i> CD	-10.5 ± 3.2	+1.8 ± 10.9
2MN/ <i>Xmα</i> CD	-25.1 ± 2.9	-26.5 ± 9.7
2MN/ <i>Xmβ</i> CD	-11.3 ± 3.3	+8.6 ± 11.1
2MN/ <i>Xmγ</i> CD	-9.4 ± 1.2	+6.5 ± 4.0
2MN/ α CD ^a	-30.9 ± 0.8	-59.8 ± 2.0
2MN/ β CD ^a	-15.0 ± 1.7	+11.7 ± 5.0
2MN/ γ CD ^a	-9.6 ± 2.5	+11.3 ± 8.4
2MN/ α HPCD ^b	-24.7 ± 1.3	-28.3 ± 4.5
2MN/ β HPCD ^b	-7.6 ± 2.1	+39.8 ± 7.1
2MN/ γ HPCD ^b	+6.3 ± 3.3	+63.3 ± 11.3

Thus, 2MN, if completely penetrated inside *mα*CD, as with other larger size CDs occurred, would provide a $\Delta S^0 > 0$. A value of (+5.1 J·K⁻¹·mol⁻¹) is obtained for 2MN/*mα*CD complexation. However, the small favorable entropy values for the *mβ*- or even *mγ*CD as compared to their natural counterparts, should mainly be attributed to the fact that 2MN movement inside a *m*CD cavity could be a little more hampered than inside the natural one. In spite of the larger *m*CD framework flexibility and better guest penetration, the fact that the O(3)-CH₃ methyls point toward the center of the cavity makes the 2MN more likely to be tightly bonded to the *m*CD than to that of its natural one. Additionally, it can be assumed that a smaller releasing of ordered water molecules from inside the more hydrophobic permethylated CDs upon complexation would contribute in the same direction.^{33,34} Something similar occurred for *Xmβ*- and *Xmγ*CD, whose complexation processes are also accompanied by relatively small $\Delta S^0 > 0$ changes. The *Xy* cap might also contribute to a better tight and hydrophobic effect. In spite of the

presumably total penetration of 2MN, both effects would give the relatively large $\Delta S^0 < 0$ for 2MN/ $Xm\alpha$ CD complexation.

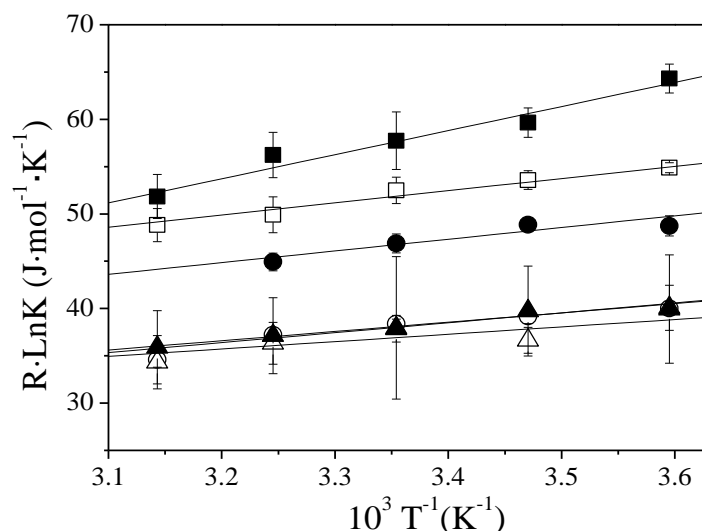


Figure 10.7. Van't Hoff plots of $R \cdot \ln K$ vs T^{-1} for the formation of 1:1 complexes of 2MN with permethylated $m\alpha^-$ (□), $m\beta^-$ (○), $m\gamma^-$ (△), $Xm\alpha^-$ (■), $Xm\beta^-$ (●) and $Xm\gamma^-$ CDs (▲).

Theoretical studies

Molecular Mechanics

Figure 10.8 shows the variation of $E_{binding}$, van der Waals and electrostatic contributions obtained upon the 2MN approaching to Xm^- and m CDs by the polar (P) and nonpolar (NP) sides (further details on the theoretical procedures were done in Chapter 5). Calculations show that the inclusion processes take place with barriers of potential that are hardly significant. Even for the smallest ring size, $m\alpha^-$ and $Xm\alpha^-$ CDs, total penetration takes place, but in a different manner than the 2MN complexation with natural α CD.^{22,24} As collected in Table 10.4, structures of Minimal Binding Energies (MBE) for m CDs were reached at approx. y (in Å) = +3.8 (+3.0), +2.2 (-1.8) and +2.1 (+0.4) for $m\alpha^-$, $m\beta^-$ and $m\gamma^-$ CDs systems by P (NP) approaching respectively. As permethylated CDs have deeper cavities than natural ones, these coordinates correspond to the structures where 2MN is totally or rather buried inside the CD cavities.

$E_{binding}$ values at the coordinate of MBE, which are also collected in Table 10.4, were -89.5 (-77.6), -66.5 (-69.3) and -55.5 (-53.4) $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectively, which really means that no large differences for $E_{binding}$ were found between both types of P or NP penetrations. However, the 2MN guest slightly prefers to penetrate by the polar side for

$m\alpha$ - and $m\gamma$ CDs, whereas, for $m\beta$ CD it apparently also likes apolar inclusion. Nevertheless, E_{binding} seems to decrease with the macroring size as binding constants and ΔH^0 do. Most of the E_{binding} is due to van der Waals host-guest interactions at any y coordinate for any of the guest-host complexation processes. The electrostatic interactions hardly change upon complexation and they are more significant at the MBE for $m\alpha$ CD. Their impact on E_{binding} decreases with CD size.

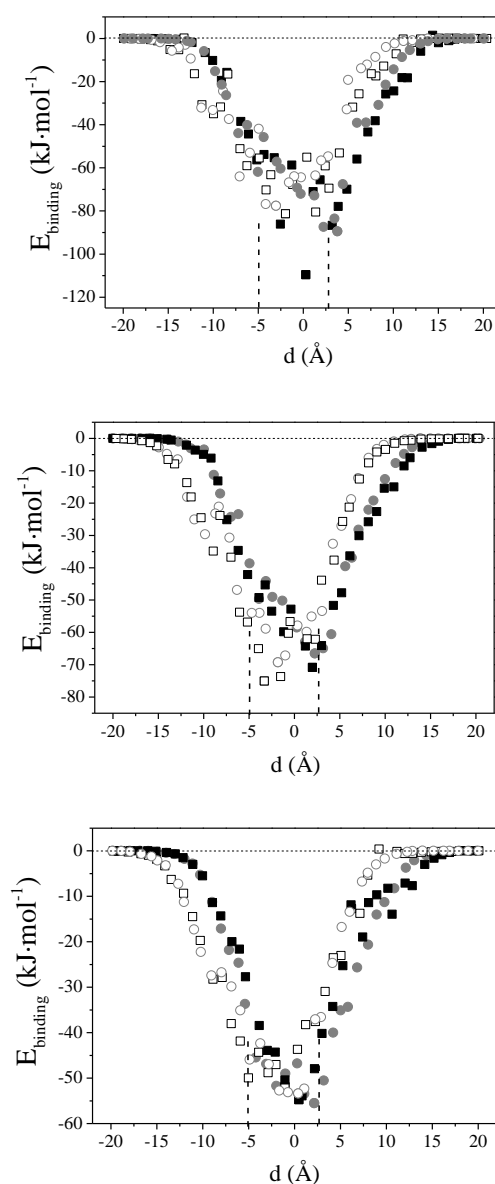


Figure 10.8. Binding energies as a function of the distance (Å) for a 2MN Polar (solid symbols) and Non-polar approaching (open symbols) for α - (upper), β - (middle), γ - (bottom) Xm CDs (squares) and m CD (circles). Dashed lines represent the y coordinate for the center of mass of primary (left) and secondary (right) methyl carbon atoms from both CDs.

Table 10.4. Coordinate y for the center of mass of naphthalene from 2MN (equivalent to the oo' distance, d , in absolute value), distance between center of naphthalene ring (guest) and Xy group (d'), binding energies (and contributions) and interaction energies between xylylene CD moiety and 2MN for the minima binding energy structures of the 2MN/host (m CD or Xm CD) 1:1 complexes by polar (P) and **non-polar** (NP) approaching, obtained by MM.

Parameters	PX $m\alpha$ CD NPX $m\alpha$ CD	PX $m\beta$ CD NPX $m\beta$ CD	PX $m\gamma$ CD NPX $m\gamma$ CD	P $m\alpha$ CD NP $m\alpha$ CD	P $m\beta$ CD NP $m\beta$ CD	P $m\gamma$ CD NP $m\gamma$ CD
d (y coordinate) (Å)	+0.2 -2.0	+1.9 -3.4	+0.5 -1.0	+3.8 -3.0	+2.2 -1.8	+2.1 +0.4
d' (Å)	5.9 8.1	7.0 10.8	7.2 8.1	--- ---	--- ---	--- ---
E_{bin} (kJ·mol⁻¹)	-109.6 -81.4	-70.9 -75.1	-54.8 -51.9	-89.5 -77.6	-66.5 -69.3	-55.5 -53.4
Electrostatics	-16.9 -14.8	2.8 -2.5	2.8 1.8	-7.8 -12.3	5.2 -6.3	-1.4 -1.3
van der Waals	-92.7 -66.6	-73.7 -72.6	-57.6 -53.7	-81.7 -65.3	-71.7 -63.0	-54.1 -52.1
E_{int} Xy-2MN (kJ·mol⁻¹)	-8.0 -1.0	-4.3 -0.4	-10.5 +8.6	--- ---	--- ---	--- ---

The incorporation of the xylylene moiety means, as collected in Table 10.4, even deeper penetration and a better stabilization inside the cavity. Binding energies at the coordinate of MBE were -109.6 (-91.4), -70.9 (-75.1) and -54.8 (-51.9) kJ·mol⁻¹ for $Xm\alpha$ -, $Xm\beta$ - and $Xm\gamma$ CDs by 2MN P (NP) approaching respectively. Binding energies for $Xm\alpha$ - and $Xm\beta$ CDs are slightly more favorable than their methylated $m\alpha$ - and $m\beta$ CDs counterparts. $Xm\gamma$ - and $m\gamma$ CDs, as occurred for binding constants (and ΔH^0), almost exhibit nearly similar values. As shown, the 2MN guest also prefers to penetrate by the polar side, the exception again is $Xm\beta$ CD. Other features relative to van der Waals and electrostatics contributions were similar to those for their permethylated counterparts. It is interesting to point out that what also contributes to the stabilization is the presence of attractive 2MN-Xylylene group interactions which, when 2MN approaches by its polar side, represent 7-20% of the $E_{binding}$. This interaction almost disappears or is even repulsive for NP approaching. The distances between the center of mass of naphthalene (o') and benzene (from Xy) groups are 5.9 (8.1) Å, 7.0 (10.8) Å and 7.2 (8.1) Å for $Xm\alpha$ -, $Xm\beta$ - and $Xm\gamma$ CDs systems by P (NP) approaching respectively. The 2MN location inside the cavity and its possible guest-Xy interactions agree with the values and signs of the experimentally observed thermodynamic parameters, ΔH^0 and ΔS^0 . The ϵ values surrounding 2MN would therefore match the polarity of the inner m - and Xm CD cavities.

In addition, at these naphthalene-Xy distances, the efficiency for the energy transfer is nearly zero, which would also agree with the absence of any experimental evidence for the Xy-2MN transfer when the complex is formed. As an example, Figure 10.11 (*left*) depicts MBE structures for the 1:1 X m CD complexes with 2MN by polar approaching.

Complexation causes a slight decrease in the total potential energy for the systems studied. Mainly responsible for such decreases are the non-bonded van der Waals interactions, although they are not the largest contribution to E_{tot} . The electrostatics interactions hardly change upon complexation. The strain energy is the main contribution to E_{tot} and it slightly increases (decreases) upon the P (NP) approaching of the guest.

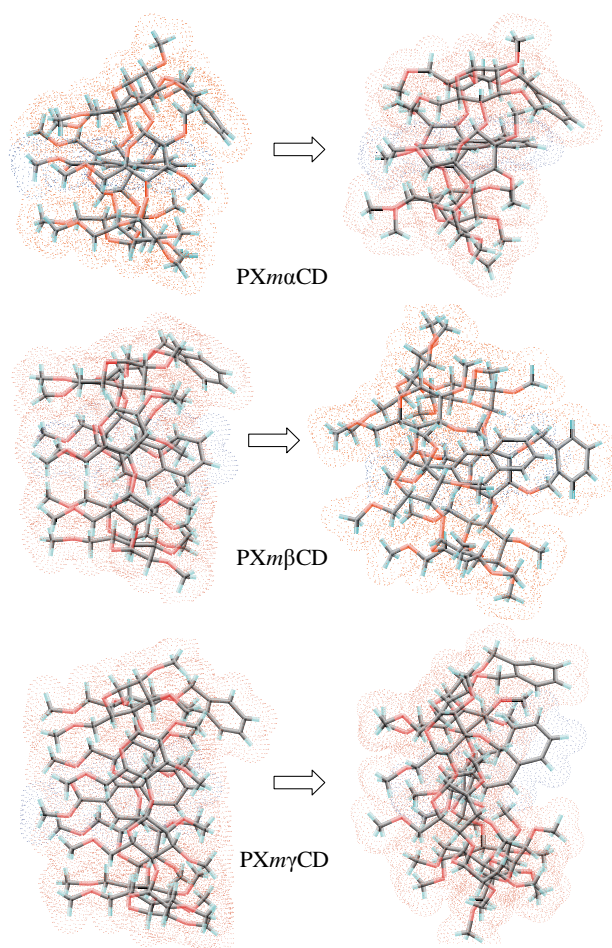


Figure 10.9. Structures of MBE for 2MN:X m CD 1:1 complexes obtained from the MM calculations (*left*) and from the analysis of MD simulations (*right*).

Molecular Dynamics

Figure 10.10 (*left*) depicts the y coordinate of the center of mass of the naphthalene ring during the 1ns MD trajectories where 2MN approaches $XmCD$ s by the P and NP sides. Dotted lines in the same figure show the y coordinate of the planes that contain the C atoms of secondary methyl groups ($y = +2.5$ Å) and primary ones ($y = -4.9$ Å) for the undistorted CDs. The bridging O atoms were initially located at ($y=0$).

With the exception of the last part of the trajectory for $Xm\gamma CD$ (and $m\gamma CD$, not shown) by polar approaching, the center of mass of the naphthalene ring for the 2MN guests lies between, or near, the dashed lines that limit the cavity entrance throughout the whole MD trajectory. This means that the 2MN guest penetrates totally or almost totally inside the $XmCD$ and mCD cavities. Figure 10.10 (*right*) also shows the decreasing in the binding energies for $Xm\gamma CD$ and $m\gamma CD$ (not shown). This probably is a consequence of their low association constants.

Table 10.5 collects some geometrical and energetically parameters that define the relative host-guest orientation. This table also lists the average of the distances between the center of mass of the naphthalene ring (d) and glycosidic oxygens and between both centers of xylylene and naphthalene groups (d').

Table 10.5. Averages of coordinate y for the center of mass, o' , of naphthalene from 2MN (d , distance) and distance between center of naphthalene ring and Xy group (d'). Averages of binding energies (and contributions) and interaction energies between xylylene CD moiety and 2MN for the 2MN/host (mCD or $XmCD$) 1:1 complexes by polar (P) and **non-polar** (NP) approaching, obtained from the analysis of the MD simulations in the presence of water.

Parameters	PX $m\alpha$ CD NPX $m\alpha$ CD	PX $m\beta$ CD NPX $m\beta$ CD	PX $m\gamma$ CD NPX $m\gamma$ CD	P $m\alpha$ CD NP $m\alpha$ CD	P $m\beta$ CD NP $m\beta$ CD	P $m\gamma$ CD NP $m\gamma$ CD
d (y coordinate) (Å)	0.85 0.27 2.8 0.2	2.6 0.6 6.3 0.4	4.3 2.6 4.3 1.4	2.9 0.2 4.6 1.5	1.0 0.4 3.6 1.1	10.2 4.6 4.8 0.8
d' (Å)	3.9 4.5 0.6 9.2	5.8 0.4 14.5 0.4	0.2 7.2 -10.3 4.5	---- ----	---- ----	---- ----
E_{bin} (kJ·mol⁻¹)	-96.1 13.0 -101.6 13.0	-94.5 12.1 -71.1 8.8	-52.7 23.4 -67.3 21.6	-97.8 13.0 -87.3 13.0	-75.2 13.0 -42.6 8.8	-14.6 10.0 -36.4 7.9
Electrostatics	-20.5 5.4 -24.7 4.6	-13.8 4.2 -9.6 3.8	-4.2 10.0 -5.4 5.4	-24.7 5.0 -20.9 5.4	-12.1 7.1 -1.7 3.8	-1.3 2.9 -1.7 2.9
van der Waals	-85.7 13.0 -76.9 12.5	-81.1 12.1 -61.9 8.8	-48.1 20.0 -62.3 9.6	-76.9 12.5 -66.5 12.2	-63.1 11.3 -41.0 8.8	-13.4 12.5 -34.3 6.7
E_{int} Xy-2MN (kJ·mol⁻¹)	-12.1 3.8 -2.5 3.8	-5.9 4.2 -0.4 0.4	-7.9 7.5 0.4 0.8	---- ----	---- ----	---- ----

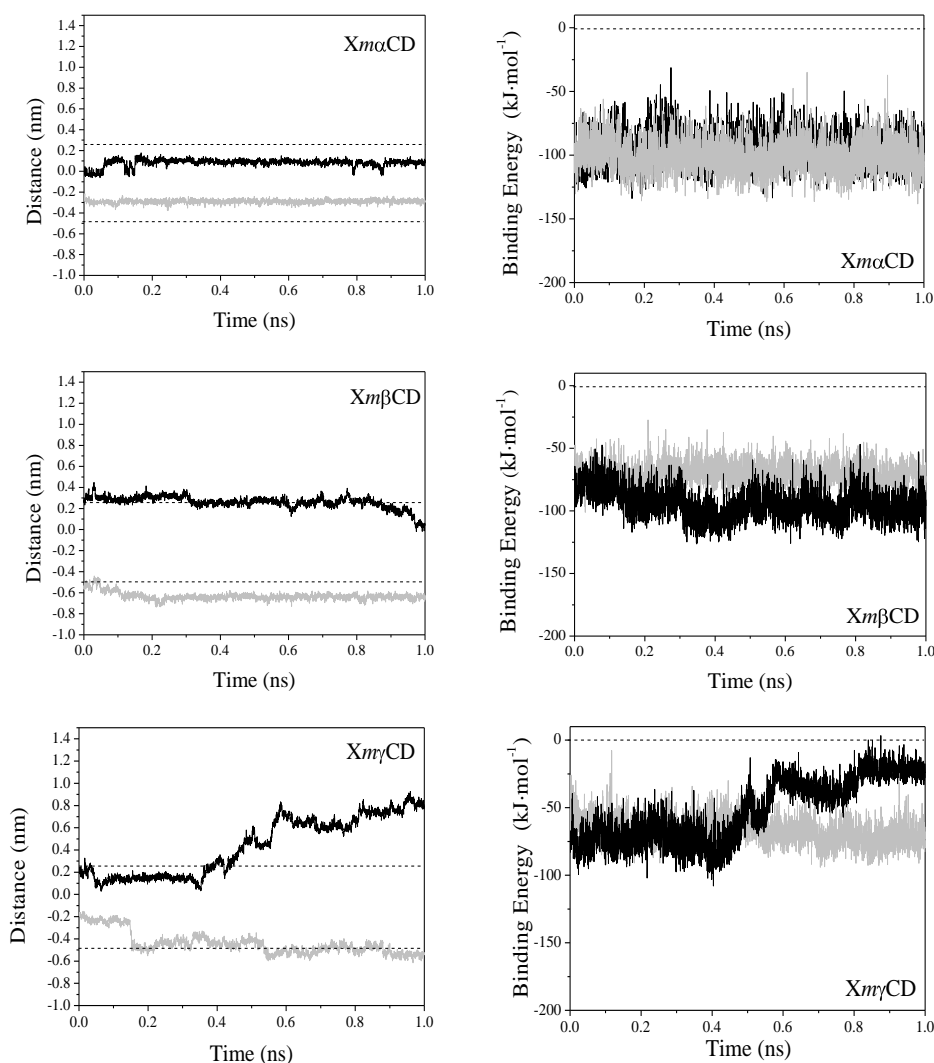


Figure 10.10. Histories of the distance between the center of mass of the naphthalene group from the 2MN guest and glycosidic CD oxygen atoms for Xm CDs (left), as well as host:guest binding energies (right) obtained from the analysis of MD trajectories. Both P (black) and nP (gray) approaches were considered. Dashed lines represent the y coordinate for the center of mass of primary (down) and secondary (upper) methyl carbon atoms.

The negative average of binding energies for all 2MN/ Xm CD and 2MN/ m CD systems indicates that the structures of 1:1 complexes are stable, those containing the xylene moiety being slightly more stable. The Xy group slightly contributes to the complex stabilization. Nevertheless, the average of binding energies does not seem to show any more polar or non-polar favorable 2MN to CD approaches. As previously obtained with MM, binding energies become more negative as the CD macroring size decreases, with most of the stabilization coming from van der Waals interactions. Electrostatics interactions always represent less than ~20% of average binding energies.

The total potential energy of the systems and all its contributions follow the predicted behavior, generally showing a parallel increase with system size. Figure 10.9 (*right*) depicts MBE structures for the 1:1 *XmCD* complexes with 2MN by polar approaching obtained from the MD 1ns trajectory analysis.

10.3 Conclusions

The thermodynamics for the complexation of a fluorescence probe which is sensitive to medium polarity, 2MN with *XmCDs* were studied and the results were compared to those obtained for the complexation with their permethylated partners (*mCDs*). Binding constants for 1:1 2MN/*XmCD* complexes are larger than for 2MN/*mCD* ones. Nevertheless, the Xy group effect on the stabilization, is hardly significant for *XmγCD*. Results also reveal that permethylated *mCD* cavities are more hydrophobic than their natural counterparts (ϵ values of less than 10, 25 and 52 for *mα*-, *mβ*- and *mγ*CDs respectively). Nevertheless, bonding the xylylene hydrophobic moiety to the secondary face of *mCD* creates a quite similar apolar microenvironment cavity with $\epsilon \sim 28$ for any of the *XmCDs*.

All 2MN complexes either with *mCD* or *XmCD* systems provide $\Delta H^0 < 0$, typical of attractive van der Waals interactions which are usually less favorable or more unfavorable as the CD cavity size relative to the guest molecule increases. This is the reason why adding the Xy moiety to *mCDs*, leads to more favorable ΔH^0 by additional attractive 2MN-xylylene group interactions. The ΔS^0 signs accompanying the *m*- and *XmCD* complexation were explained on the basis that 2MN fully penetrates inside any of the hydrophobic methylated *m*- and *XmCDs* and the fact that the guest movement inside these cavities could be more hindered than inside their natural partner. The Xy cap might also contribute to a better tighten and hydrophobic effect.

MM and MD calculations confirm that the 1:1 inclusion complexes of the 2MN guest with *mCD* or *XmCD* can feasibly form by deeply penetrating inside CD cavities. Binding energies decrease with the size of the macroring in the same manner as binding constants and enthalpy changes. Binding energies for *Xmα*- and *Xmβ*CDs are slightly more favorable than their methylated *mα*- and *mβ*CDs counterparts. As occurred for binding constants (and ΔH^0), *Xmγ*- and *mγ*CDs exhibit similar values. The proposed structures for the complexes and the possible 2MN-xylylene interactions agree with the sign and quantitative values of the experimentally obtained thermodynamics parameters.

10.4 References

- (1) Mendicuti, F. *Trends Phys. Chem.* **2006**, *11*, 61.
- (2) Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- (3) Bhosale, S. V.; Bhosale, S. V. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2007**, *4*, 231.
- (4) Breslow, R. *Biol. Zh. Arm.* **2001**, *53*, 117.
- (5) McNally, B. A.; Leevy, W. M.; Smith, B. D. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 29.
- (6) Loftsson, T.; Duchene, D. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1.
- (7) Engeldinger, E.; Armspach, D.; Matt, D. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4147.
- (8) Liu, Y.; Chen, Y. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 681.
- (9) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7071.
- (10) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 5177.
- (11) Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7186.
- (12) McAlpine, S. R.; Garcia-Garibay, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4269.
- (13) Yamauchi, K.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5024.
- (14) Park, J. W.; Lee, S. Y.; Song, H. J.; Park, K. K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9505.
- (15) Clark, M.; Cramer, R. D., III; Van, O. N. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982.
- (16) González-Álvarez, M. J.; Balbuena, P.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717.
- (17) González-Álvarez, M. J.; Vicente, J.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975.
- (18) Carmona, T.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F.; Tagliapietra, S.; Martina, K.; Cravotto, G. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 22431.
- (19) Balbuena, P.; Lesur, D.; González-Álvarez, M. J.; Mendicuti, F.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Commun.* **2007**, 3270.
- (20) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1579.
- (21) Madrid, J. M.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2037.
- (22) Madrid, J. M.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1621.

- (23) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, 58, 295.
- (24) Madrid, J. M.; Pozuelo, J.; Mendicuti, F.; Mattice, W. L. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 193, 112.
- (25) Madrid, J. M.; Villafruela, M.; Serrano, R.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4847.
- (26) Pastor, I.; Di Marino, A.; Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 1995.
- (27) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **2004**, 58, 823.
- (28) Di Marino, A.; Rubio, L.; Mendicuti, F. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, 58, 103.
- (29) Shi, J.; Guo, D.-S.; Ding, F.; Liu, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 923.
- (30) Di Marino, A.; Mendicuti, F. *Appl. Spectrosc.* **2002**, 56, 1579.
- (31) Reinhardt, R.; Richter, M.; Mager, P. P. *Carbohydrate Research* **1996**, 291, 1.
- (32) Koji, K.; Taizo, I.; Shigeru, N. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **1995**, 22, 285.
- (33) Schönbeck, C.; Westh, P.; Madsen, J. C.; Lambertsen Larsen, K.; Wagner Städe, L.; Holm, R. *Langmuir* **2011**, 27, 5832.
- (34) Nishijo, J.; Yasuda, M.; Nagai, M.; Sugiura, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 761.

Summary and Conclusions

This Thesis was focused on the supramolecular chemistry field. Different processes, where the non-covalent cyclodextrin-cyclodextrin and/or cyclodextrin-guest molecule interactions are involved, were investigated. The first part of this dissertation comprises the study of the thermodynamics of the complexation of some commercially available CDs with several polarity and microviscosity probes. The main aim is to apply the circular dichroism technique to clarify the structure of the complexes formed. On the other hand, the solution behavior and thermodynamics of the self-aggregation in aqueous solution of a newly series of modified CDs containing chromophore (xylylene and naphthalene) groups and their inclusion complexes with some microenvironment sensitive guest molecules were also investigated. We demonstrated that these modified CDs, depending on the appended moiety, can undergo a conformational equilibrium, where the substituent may act by blocking or facilitating the entry into the cavity and a self-aggregation into dimers and /or non-covalent oligomers. Both processes can compete with complexation and could be used to regulate the inclusion of guest molecules.

To carry out all the research work a wide variety of spectroscopic techniques such as UV-absorption, steady-state and lifetime fluorescence techniques and circular dichroism, as well as theoretical simulations (Molecular Mechanics and Molecular Dynamics) were employed.

This work can be **summarized** in the following points:

1. Tuning a circular dichroism instrument and studying its applications in the supramolecular chemistry, in particular in the field of inclusion phenomena with cyclodextrins as host molecules.
2. Application of the circular dichroism technique to the study of the complexation of two polarity sensitive guest molecules, the 2,3-dimethyl naphthoate (23DMN) and 1-methyl naphthoate (1MN), with 2-hydroxypropyl α -, β - and γ -cyclodextrins (HPCD). The analysis of the results allowed elucidating the structures of the complexes. These structures were compared to those derived from fluorescence measurements and Molecular Mechanics calculations.

3. Study of the self-association process of 2^I,3^I-O-(*o*-xylylene)-per-O-Me- α -, β - and γ -CDs (*XmCD*) in water based on the fluorescence of the bidentate xylylene moiety. Lifetime averages ($\langle\tau\rangle$) obtained from analysis of decay profiles for *XmCD*/water solutions at different temperatures allowed us to obtain dimerization equilibrium constants, K_D , and thermodynamics parameters during association. In addition, the complexation of α,α' -dimethoxy-*o*-xylylene (*oXy*) as a model compound for the *o*-xylylene moiety and the heteroassociation of *XmCD* with its corresponding heptakis(2,3,6,-tri-O-methyl)-CDs (*mCD*s) respectively, were also studied. Theoretical calculations were performed to investigate the conformational behaviour of isolated *XmCD* in the vacuo at different temperatures and to simulate the dimerization processes in water.

4. Study of the behavior in water and in organic solvents of 2^I,3^I-O-(1,8-naphthylene)-per-O-Me- α -, β - and γ -CDs (*Nm β CD*), which contains a naphthyl cap-like moiety. Dimerization equilibrium constants, thermodynamic parameters upon association and information about the possible conformations in water and organic solvents were obtained by using fluorescence, circular dichroism and Molecular Mechanics and Molecular Dynamics. The complexation of 1,8-dimethoxynaphthalene (*oNy*) and the hetero-association of *NmCD*, both with *mCD*, were also studied.

5. Study of the complexation of methyl 2-naphthalenecarboxylate (2MN), a fluorescent probe, with 2^I,3^I-O-(*o*-Xylylene)-per-O-Me- α -, β - and γ -cyclodextrins (*Xm α* -, *Xm β* - and *Xm γ* CDs respectively) which also have the capacity to self-aggregate. The influence of the xylylene moiety was assessed by comparing the data of 2MN complexation by *Xm α* -, *Xm β* - and *Xm γ* CD with those obtained for their fully permethylated, *m α* -, *m β* - and *m γ* CD counterparts. The 2MN emission spectrum shows two overlapping electronic bands whose ratio of intensities, *R*, is very sensitive to the polarity of the surrounding medium. The stoichiometry, the complex formation constants and the ΔH^0 and ΔS^0 parameters upon inclusion were obtained from the variations in *R* and $\langle\tau\rangle$ as a function of CD concentration and temperature. Molecular Mechanics and Molecular Dynamics calculations were performed to simulate the complexation processes in the presence of water, determine their preferred structures and the forces responsible for their formation.

From the research work done in this Thesis the following **conclusions** are proposed:

1. The Induced Circular Dichroism (ICD) spectra of the of 2, 3-dimethyl naphthoate and 1-methyl naphthoate with 2-hydroxypropyl α -, β - and γ -cyclodextrins sign varies depending on the inclusion of the chromophore in the CD cavity and the orientation of its electronic transition moment relative to the CD n-fold rotational axis. The analysis of these spectra supported the experimental data obtained by fluorescence and are in agreement with the minima binding structures theoretically obtained, demonstrating that the ICD is a simple and reliable method to determine the structure of inclusion complexes in solution. Thus:

- The 23DMN forms complexes of stoichiometry 1:1 with α -, β - and γ HPCDs. In these complexes the long naphthalene axis is nearly parallel to the n-fold rotation CD axis. There is a full penetration of 23DMN inside β - and γ HPCD, but in case of α HPCD, the inclusion is not total.

- 1MN forms 1:1 inclusion complexes with the three types of HPCDs, where the short naphthalene axis is nearly parallel to the n-fold rotation CD axis. Similar to 23DMN/HPCDs, 1MN does not totally penetrate in the α HPCD cavity, but when β - and γ HPCDs are used as hosts, this penetration is notably deeper.

2. The 2^I, 3^I-O-(*o*-xylylene)-per-O-Me-cyclodextrins are able to self-aggregate in aqueous dilute solutions.

- From the fluorescence decay profiles of xylylene moiety three lifetime components are obtained. Two of them were ascribed to the monomer and dimer species and the short-lived one to the scattering.

- The dimerization constants, K_D , at 25 °C are similar and relatively small, $177 \pm 80 \text{ M}^{-1}$, $200 \pm 74 \text{ M}^{-1}$ and $248 \pm 75 \text{ M}^{-1}$ for $Xm\alpha$ -, $Xm\beta$ - and $Xm\gamma$ CD respectively.

- All the Xm CDs dimerization processes are enthalpically governed and entropically disfavoured. The $\Delta H^0 < 0$ values are typical of attractive van der Waals interactions, whereas the $\Delta S^0 < 0$ values corresponded to the loss of freedom degrees during association.

- The Xm CDs monomers present an *open* \rightleftharpoons *capped* equilibrium which is displaced to the *open* conformation. The most stable dimers are formed by head-to-head

$XmCD$ approaching (in *open* conformation), where both Xy groups favorably interact, without penetrating into the cavity of the neighbor $XmCD$.

- In the case of the dimer $(Xm\gamma CD)_2$ the formation of stable head-to-tail dimers is not dismissed, although the structures formed by the association of more than two units are energetically unfavorable.

3. The 2¹,3¹-*O*-(1,8-naftaleno)-per-*O*-Me-CDs also self-aggregate.

- For the case of $Nm\alpha CD$ ($K_D=776\times 10^3\text{ M}^{-1}$ at 25°C) and $Nm\beta CD$ ($K_D=92\times 10^3\text{ M}^{-1}$ at 25°C) the dimerization constants in water are much larger than those previously obtained for $XmCD$ s.

- The processes of association for $Nm\alpha CD$ and $Nm\beta CD$ are enthalpy and entropy favored. The $\Delta H^0 < 0$ values are quite similar to those obtained for the $(XmCD)_2$ formation. However, the $\Delta S^0 > 0$ is in contrast with the negative value obtained for $XmCD$ s. This sign is attributed to the much higher loss of solvation order during dimerization in the case of the larger naphthyl groups compared with the benzene rings.

- For the $Nm\gamma CD$, the dimerization constant ($K_D = 401\text{ M}^{-1}$ at 25°C) is considerably smaller than for $Nm\alpha$ - and $Nm\beta CD$ s, but remains higher than its analogue with xylylene. Although the entropy is $\Delta S^0 > 0$ (as in the rest of $NmCD$ s), the process is accompanied by a $\Delta H^0 > 0$. Its large size and conformational flexibility are responsible for a weakening in the intermolecular interactions of the dimer.

- For all the $NmCD$ s, the dimer formation is more favorable in high polarity solvents and does not dissociate in the presence of strong complexation guests.

- The theoretical results support the absence of any *open* \rightleftharpoons *capped* equilibrium and the isolated monomer is stable in an *open* conformation, very similar for the three $NmCD$ s.

- The head-to-head-type approaching are the most stable for the $Nm\alpha$ - and $Nm\beta CD$ s dimers, where the naphthyl moieties are relatively close to each other to couple their transition moments but without forming excimers. They are also relatively shielded from the solvent, although they do not penetrate inside the cavity of the neighbor CD.

- In the case of $Nm\gamma CD$ of head-to-tail-type dimer structures are the most stable and the presence of associations in head-to-tail-trimers and oligomers could be energetically possible.

4. The *Xm*CDs and their permethylated partners form inclusion complexes with a fluorescence probe which is sensitive to medium polarity, 2-methyl naphthoate:

- The stoichiometry for all the systems are 1:1 and the binding constants for the 2MN/*Xm*CD complexes are larger than for 2MN/*m*CD ones.
- The *m*CD cavities are more hydrophobic than their natural counterparts (ϵ values of less than 10, 25 and 52 for *m* α -, *m* β - and *m* γ CDs respectively), whereas the *Xm*CDs show a quite similar apolar microenvironment cavity with $\epsilon \sim 28$ for any of them.
- All 2MN complexes either with *m*CD or *Xm*CD systems provide $\Delta H^0 < 0$, typical of attractive van der Waals interactions which are usually less favorable as the CD cavity size relative to the guest molecule increases. Adding the Xy moiety to *m*CDs leads to more favorable ΔH^0 by additional attractive 2MN-xylylene group interactions.
- The ΔS^0 signs accompanying the *m*- and *Xm*CD complexation can be explained on the basis that 2MN fully penetrates inside any of the hydrophobic methylated *m*- and *Xm*CDs and the fact that the guest movement inside these cavities could be more hindered than inside their natural partner. The Xy cap might also contribute to a better tightening and hydrophobic effect.
- The binding energies decrease with the size of the macroring in the same manner as binding constants and enthalpy changes. These energies for *Xm* α - and *Xm* β CDs are slightly more favorable than their methylated *m* α - and *m* β CDs counterparts. As occurred for binding constants (and ΔH^0), *Xm* γ - and *m* γ CDs exhibit similar values.

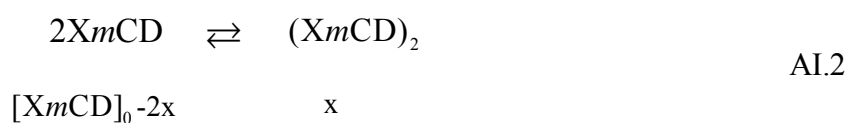
Anexo I

Constantes de dimerización

Para el proceso de dimerización dado por el equilibrio:



la concentración de cada especie en el equilibrio será



y la constante de dimerización, K_D , viene expresada como:

$$K_D = \frac{[(XmCD)_2]}{[XmCD]^2} = \frac{x}{([XmCD]_0 - 2x)^2} \quad \text{AI.3}$$

Si despejamos x de la expresión anterior obtenemos:

$$x = [(XmCD)_2] = \frac{4 K_D [XmCD]_0 + 1 - \sqrt{8 K_D [XmCD]_0 + 1}}{8 K_D} \quad \text{AI.4}$$

Por otro lado, el promedio de tiempo de vida viene dado por :

$$\langle \tau \rangle = f_{XmCD} \tau_{XmCD} + f_{(XmCD)_2} \tau_{(XmCD)_2} \quad \text{AI.5}$$

siendo f la fracción de fluorescencia de monómero o dímero en cada caso y τ su tiempo de vida correspondiente.

La intensidad de fluorescencia por grupo cromóforo de cada especie, I , se define como el producto de la concentración de la especie, su eficiencia cuántica (por unidad de cromóforo), ϕ , y una constante de proporcionalidad, k' , que viene dada por el espectrofluorímetro, las condiciones de medida etc.

$$I_{XmCD} = k' \phi_{XmCD} [XmCD] \quad \text{AI.6}$$

$$I_{(XmCD)_2} = k' \phi_{(XmCD)_2} [(XmCD)_2] \quad \text{AI.7}$$

El parámetro f de monómero y de dímero se puede definir como :

$$f_{XmCD} = \frac{I_{XmCD}}{I_{XmCD} + 2 I_{(XmCD)_2}} \quad \text{AI.8}$$

sustituyendo las Ecuación AI.3, AI.6 y AI.6 en la expresión anterior y simplificando términos obtenemos:

$$f_{XmCD} = \frac{k' \phi_{XmCD} [XmCD]}{k' \phi_{XmCD} [XmCD] + 2 k' \phi_{(XmCD)_2} [(XmCD)_2]} = \frac{\phi_{XmCD}}{\phi_{XmCD} + 2 \phi_{(XmCD)_2} K_D [XmCD]} \quad \text{AI.9}$$

$$f_{(XmCD)_2} = 1 - f_{XmCD} = \frac{2 \phi_{(XmCD)_2} K_D [XmCD]}{\phi_{XmCD} + 2 \phi_{(XmCD)_2} K_D [XmCD]} \quad \text{AI.10}$$

La concentración de monómero en el equilibrio se puede obtener a partir de las Ecuaciones AI.2 y AI.4:

$$[XmCD] = [XmCD]_0 - 2x = \frac{-1 + \sqrt{8 K_D [XmCD]_0 + 1}}{4 K_D} \quad \text{AI.11}$$

Si sustituimos en la Ecuación AI.5, los términos obtenidos por las Ecuaciones AI.9, AI.10 y AI.11 y reajustamos tenemos la ecuación:

$$\langle \tau \rangle = \frac{2\tau_{XmCD} + (\phi_{(XmCD)_2} / \phi_{XmCD}) \tau_{(XmCD)_2} (\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)}{2 + (\phi_{(XmCD)_2} / \phi_{XmCD}) (\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)} \quad \text{AI.12}$$

Por otra parte, la intensidad de fluorescencia observada en una disolución de $XmCD$ puede describirse como la suma de las contribuciones debidas a la fluorescencia del monómero y del dímero:

$$\begin{aligned} I &= I_{XmCD} + I_{(XmCD)_2} = \phi_{XmCD} [XmCD] + 2\phi_{(XmCD)_2} [(XmCD)_2] = \\ &= \phi_{XmCD} [XmCD] + 2\phi_{(XmCD)_2} K_D [XmCD]^2 \end{aligned} \quad AI.13$$

Reorganizando la AI.13 y sustituyendo en ella las Ecuaciones AI.4 y AI.11, se obtiene la Ecuación AI.14 que relaciona la intensidad de emisión de fluorescencia y la concentración inicial de ciclodextrina $[XmCD]_0$:

$$I = \phi_{(XmCD)_2} \frac{(4K_D[XmCD]_0 + 1) - \sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1}}{4K_D} + \phi_{XmCD} \frac{(\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)}{4K_D} \quad AI.14$$

que puede ser reescrita como:

$$I = \phi_{(XmCD)_2} [XmCD]_0 - (\phi_{(XmCD)_2} - \phi_{XmCD}) \frac{(\sqrt{8K_D[XmCD]_0 + 1} - 1)}{4K_D} \quad AI.15$$

Anexo II

Desarrollo de las ecuaciones de las constantes de complejación

-CASO A: Ausencia de procesos de dimerización en las ciclodextrinas

Para un sistema huésped:anfitrión del tipo 2MN:CD_n de estequiometría 1:n, cuyo equilibrio se define como :



La constante de complejación K , viene definida como:

$$K = \frac{[2\text{MN}:\text{CD}]}{[2\text{MN}][\text{CD}]^n} \quad \text{AII.2}$$

Para una estequiometría 1:1, si la concentración total de 2MN y CD es respectivamente:

$$[2\text{MN}]_0 = [2\text{MN}] + [2\text{MN}:\text{CD}] \quad \text{AII.3}$$

$$[\text{CD}]_0 = [\text{CD}] + [2\text{MN}:\text{CD}] \quad \text{AII.4}$$

la fracción molar de complejo formado lo puedo definir como:

$$f_2 = \frac{[2\text{MN}:\text{CD}]}{[2\text{MN}]_0} \quad \text{AII.5}$$

Aplicando la Ecuación AII.2 y asumiendo que la $[\text{CD}] \gg [2\text{MN}:\text{CD}]$, podemos relacionar la constante de complejación con la concentración de ciclodextrina inicial mediante:

$$f_2 = \frac{K [\text{CD}]_0}{1 + K [\text{CD}]_0} \quad \text{AII.6}$$

Esta expresión va a ser válida siempre y cuando la ciclodextrina libre esté en exceso comparada con la cantidad que forma parte del complejo, haciendo que por tanto $[CD]_0 \approx [CD]$ en la Ecuación AII.4. Esta suposición implica que la cantidad de $[2MN]$ tiene que ser muy baja comparada con la $[CD]_0$ y que la constante de complejación tampoco debe de ser muy alta. Si $K [2MN] \ll 1$ esta aproximación es totalmente válida. En nuestro caso la $[2MN] \sim 3 \times 10^{-5}$ y las K obtenidas están entorno a $\sim 10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}$ para una estequiometría 1:1 para todos los sistemas, así que dicha hipótesis es totalmente válida.

Asumiendo que existen dos especies que fluorescen en el equilibrio, la sonda libre y la sonda complejada, la constante de complejación se puede relacionar con la $[CD]_0$, a través de relaciones no lineales que existen con las propiedades de fluorescencia, obtenidas mediante estado estacionario o tiempos de vida:

$$(a) \quad \frac{I}{I_0} = \frac{1 + (I_\infty / I_0) K [CD]_0^n}{1 + K [CD]_0^n} \quad \text{AII.7}$$

donde I representa el valor de intensidad de fluorescencia a cada concentración de ciclodextrina. Los subíndices ∞ y 0 corresponden al valor de I para la $[CD]_0=0$ y para el valor extrapolado de $[CD] \rightarrow \infty$.

$$(b) \quad R = \frac{R_0 + R_\infty \Phi K [CD]_0^n}{1 + \Phi K [CD]_0^n} \quad \text{AII.8}$$

donde R es la relación de intensidades de las dos bandas características del espectro de emisión de los derivados de naftoato $R = I_{\lambda_2} / I_{\lambda_1}$. El parámetro $\Phi = I_{\infty, \lambda_1} / I_{0, \lambda_1}$ se puede obtener de los valores de $I(\lambda_1)$ a $[CD]_0=0$ y del valor extrapolado $[CD] \rightarrow \infty$, aunque es optimizado durante el proceso de ajuste a los datos experimentales. R_∞ y R_0 son valores de R cuando la sonda 2MN se encuentra totalmente libre y totalmente complejada, respectivamente.

$$(c) \quad \langle \tau \rangle = \frac{\tau_0 + \tau_\infty \Phi' K [CD]_0^n}{1 + \Phi' K [CD]_0^n} \quad \text{AII.9}$$

donde $\langle \tau \rangle$ es el tiempo de vida promedio, obtenido del análisis de los perfiles de decaimiento de fluorescencia. τ_0 y τ_∞ son el tiempo de vida para la especie libre y totalmente complejada de 2MN, respectivamente. Si el tiempo de vida se recoge a la longitud de onda de emisión λ_1 , $\Phi = \Phi'$. Si se recoge a la longitud de onda λ_2 , entonces Φ y Φ' se relacionan mediante la Ecuación AII.10:

$$\Phi'(\lambda_1) = \frac{R_0}{R_\infty} \Phi(\lambda_2) \quad \text{AII.10}$$

Las Ecuaciones anteriores AII.7, AII.8 y AII.9 se pueden linealizar obteniendo la expresión de forma general:

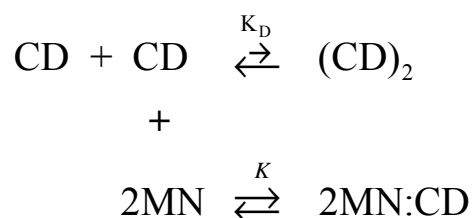
$$\frac{[\text{CD}]_0^n}{(Y_0 - Y)} = \frac{1}{K \Phi (Y_0 - Y_\infty)} + \frac{[\text{CD}]_0^n}{Y_0 - Y_\infty} \quad \text{AII.11}$$

donde Y representa cualquiera de los parámetro I, R ó $\langle \tau \rangle$.

-CASO B: Presencia de proceso de dimerización en las ciclodextrinas $2\text{CD} \rightleftharpoons (\text{CD})_2$

Algunas ciclodextrinas pueden presentar procesos de auto-asociación. Por este motivo, cuando realicemos el estudio de complejación de dichas ciclodextrinas con moléculas huésped, debemos considerar dos procesos competitivos (Esquema AII.1):

- 1) El proceso de dimerización.
- 2) El proceso de complejación.



Esquema AII.1. Equilibrios y constantes de asociación

Ambos equilibrios están caracterizados por la constante de dimerización (K_D) y la constante de complejación (K), respectivamente.

La constante de dimerización no cambia porque exista otra especie en el medio. Para el cálculo de K , debemos considerar la concentración de monómero real $[CD]$ presente en el medio, que es la especie que va a formar el complejo de inclusión con el 2MN. Así, la K_D debe tenerse en cuenta para el cálculo de K , ya que K_D va a definir la cantidad de monómero presente para cada $[CD]_0$ y temperatura. De este modo, la Ecuación AII.8 y AII.11 se puede escribir como:

$$R = \frac{R_0 + R_\infty \Phi K \left([CD]_0 - 2[(CD)_2] \right)^n}{1 + \Phi K \left([CD]_0 - 2[(CD)_2] \right)^n} \quad \text{AII.12}$$

$$\frac{\left([CD]_0 - 2[(CD)_2] \right)^n}{(Y_0 - Y)} = \frac{1}{K \Phi_1 (Y_0 - Y_\infty)} + \frac{\left([CD]_0 - 2[(CD)_2] \right)^n}{Y_0 - Y_\infty} \quad \text{AII.13}$$

Es importante señalar que la concentración de dímero $(CD)_2$ presente en el medio se obtiene a cada $[CD]_0$ y temperatura con la expresión (Ecuación AI.4, Anexo I):

$$[(CD)_2] = \frac{(4K_D[CD]_0 + 1) - \sqrt{8K_D[CD]_0 + 1}}{8K_D}$$

